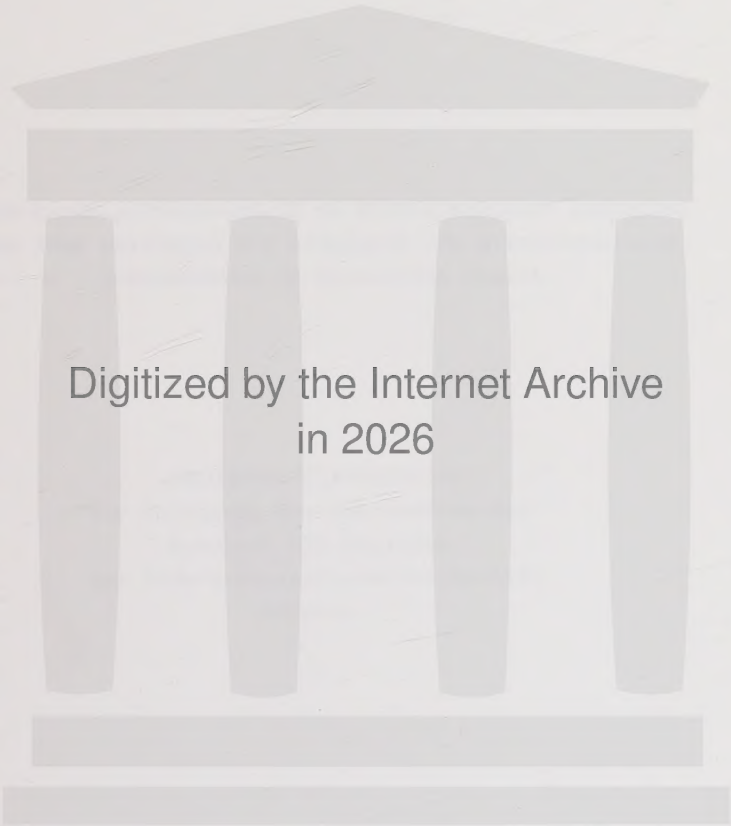
ÜBER TRANSLATIONSPRODUKTE AN MITOCHONDRIALEN RIBOSOMEN UND IHRE BEZIEHUNG ZUR BIOGENESE DER MITOCHONDRIALEN INNENMEMBRAN IN NEUROSPORA CRASSA

Rainer Michel

1972


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546014_0062

DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

Aus dem
Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. Th. Bücher

ÜBER TRANSLATIONSPRODUKTE AN MITOCHONDRIALEN RIBOSOMEN UND IHRE BEZIEHUNG ZUR BIOGENESE DER MITOCHONDRIALEN INNENMEMBRAN IN NEUROSPORA CRASSA

INAUGURAL-DISSERTATION
Zur Erlangung der Doktorwürde der
Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von

RAINER MICHEL

aus Burgkirchen/Alz

München 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Th. Bücher
Prof. Dr. B. Linzen

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.1972

Meinen lieben Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1970 bis September 1972 am Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. h.c. Theodor Bücher und Herrn PD Dr. rer. nat. Dr. med. Walter Neupert durchgeführt.

Am Ende dieser Arbeit ist es mir ein echtes Bedürfnis, Dank abzustatten: Herrn Prof. Dr. Bücher für die großzügige Förderung dieser Arbeit und Herrn Dr. Neupert, der mir stets in selbstloser Weise mit Rat und Tat zur Seite stand. Meinen Lehrern verdanke ich viele Anregungen. Danken möchte ich weiterhin Herrn A. Pfaller für seine stets unermüdliche Hilfsbereitschaft.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. EINLEITUNG 1

2. ERGEBNISSE 3

2.1. Cytosolische und mitochondriale Ribosomen 3

2.1.1. Cytosolische und mitochondriale Ribosomen mit anhängenden naszierenden Peptidketten im Saccharosedichtegradienten 3

2.1.2. Behandlung der cytosolischen und mitochondrialen Ribosomen mit Ribonuclease in verschiedenen Konzentrationen 8

2.1.3. Thermostabilität von cytosolischen und mitochondrialen Ribosomen 11

2.1.4. Ablösen der den cytosolischen und mitochondrialen Ribosomen anhängenden naszierenden Peptidketten mit Puromycin in einem zellfreien System 15

2.2. Charakterisierung der Translationsprodukte an mitochondrialen Ribosomen 18

2.2.1. Gelchromatographische Analyse der in vivo in Anwesenheit von Cycloheximid und in vitro spezifisch markierten Translationsprodukte vor und nach enzymatischer Spaltung mit Trypsin 19

2.2.2. Gelelektrophoretische Analyse der spezifisch markierten Translationsprodukte von Mitochondrien 22

2.2.3. Gelelektrophoretische Analyse der ohne Inhibitoreinfluß an den mitochondrialen Ribosomen synthetisierten Translationsprodukte von Mitochondrien 24

2.3. Getrennte Analyse der den Polysomen und Monosomen anhängenden Translationsprodukte 33

2.3.1. Gelchromatographische Analyse der den mitochondrialen Polysomen und Monosomen anhängenden Translationsprodukte 34

2.3.2. Gelelektrophoretische Analyse der den mitochondrialen monomeren und polymeren Ribosomen anhängenden Translationsprodukte 37

2.3.3. Gelelektrophoretische Analyse der den cytosolischen polymeren und monomeren Ribosomen anhängenden naszierenden Peptidketten 45

2.4. Charakterisierung der mitochondrialen Translationsprodukte nach Abgabe in die Mitochondrienmembran 45

Seite

2.4.1. Einbau von radioaktiven Aminosäuren in mitochondriale Membranen *in vivo* in Anwesenheit von Cycloheximid 46

2.4.2. Einbau von radioaktiven Aminosäuren in mitochondriale Membranen *in vitro* 54

2.5. Experimente zur Lokalisierung von mitochondrialen Ribosomen 57

3. DISKUSSION 63

3.1. Selektive Markierung der Translationsprodukte 63

3.2. Die Natur der polymeren Ribosomen 64

3.3. Die Translationsprodukte an den mitochondrialen Ribosomen 66

3.4. Die Translationsprodukte in der Membran 69

3.5. Arbeitshypothese über den Integrationsprozess von mitochondrialen Translationsprodukten 70

4. MATERIAL UND METHODEN 75

4.1. Züchtung von Neurospora crassa 75

4.2. Isolierung von Mitochondrien und mitochondrialen Ribosomen 75

4.2.1. Isolierung von mitochondrialen Ribosomen durch Lysieren der Mitochondrien und Saccharosedichtegradientenzentrifugation 75

4.2.2. Freisetzung von mitochondrialen Ribosomen aus Mitochondrien durch Ultraschallbehandlung 76

4.2.3. Freisetzung von mitochondrialen Ribosomen aus Mitochondrien durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen 77

4.3. Isolierung von cytosolischen Ribosomen 77

4.4. Isolierung von mitochondrialen Membranen 77

4.5. Präparation einer rohen Fraktion mitochondrialer und cytosolischer G-Faktoren in Anlehnung an eine von KÜNTZEL et al. (47) beschriebenen Methode 78

4.6. Spezifische Markierung des Produktes der mitochondrialen Proteinsynthese 78

4.6.1. Spezifische Markierung des Produktes der mitochondrialen Proteinsynthese *in vivo* 78

Seite

4.6.2. Spezifische Markierung des Produktes der mitochondrialen Proteinsynthese *in vitro* 79

4.7. Tryptische Spaltung der Translationsprodukte und RNase-Behandlung 79

4.8. Ablösen der Translationsprodukte von mitochondrialen und cytosolischen Ribosomen in einem zellfreien System 79

4.9. Säulenchromatographie an Sephadex G 200 und Bio-Gel P 30 80

4.10. Polyacrylamid-SDS-Gelelektrophorese 80

4.11. Radioaktivitätsmessungen 81

4.12. Proteinbestimmung 82

4.13. Materialien 82

5. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN 83

6. ZUSAMMENFASSUNG 84

7. LITERATURVERZEICHNIS 87

1. EINLEITUNG

Zwei Proteinsynthesesysteme, das von der mitochondrialen Desoxiribonucleinsäure und das von der Kern-Desoxiribonucleinsäure abhängige, kooperieren bei der Biogenese der Mitochondrien (1, 2, 3, 4). In dieser Arbeit werden Probleme des mitochondrialen Systems behandelt.

Arbeiten der letzten Jahre (5, 6) haben klargestellt, daß die eukaryotische Zelle eine Organisationsform von etwa hundert Polypeptiden für eine spezifische mitochondriale Transcription und Translation aufbaut, um eine vergleichsweise geringe Zahl von Polypeptiden für die innere Membran der Mitochondrien innerhalb dieser Zellorganellen zu gewinnen. Die Beteiligung solcher Polypeptide am Aufbau von Einheiten der Atmungskette wie das Cytochrom aa_3 (7, 8), das Cytochrom b (9) und die oligomycin-sensitive Adenosintriphosphatase (10) macht klar, daß es sich um essentielle Bestandteile der inneren Mitochondrienmembran handelt. Dem entsprechen auch eine große Zahl von Beobachtungen, daß die Hemmung der Produktion solcher Bestandteile durch genetische Defekte oder durch spezifische Inhibitoren zu einer defekten Atmungskette führt (11, 12, 13).

Die Frage nach dem biologischen Sinn dieser Gegebenheiten ist zur Zeit noch weitgehend offen. Selbst wenn man der sogenannten Endosymbiontentheorie folgend annimmt, daß ein zweites genetisches System seinen Ursprung in der Inkorporation bakterieller Einheiten in die Eukaryontenzelle hat, erscheint es ausgeschlossen, daß ein solches System im Verlauf der Phylogenie aufrecht erhalten wurde, ohne daß es einen spezifischen Beitrag leistet, der vom Kern zu bewerkstelligen ist.

Die Beantwortung dieser Fragen auf molekularer Ebene ist an das Verständnis des Prozesses der Bildung und des Einbaus des mitochondrialen Translationsproduktes gebunden. In diesem Sinne beschäftigt sich diese Arbeit mit der Erfassung der Translationsprodukte an den mitochondrialen Ribosomen und ihrem weiteren Weg in die innere Membran der Mitochondrien. Die Versuche wurden an dem Wildtyp 74 A von Neurospora crassa durchgeführt. Durch Einbau von radioaktiven Aminosäuren, vornehmlich Leucin, wurde das Translationsprodukt markiert, die mitochondrialen Ribosomen isoliert und durch Gradientenzentrifugation dargestellt. Dieses Verfahren wurde sowohl in vivo unter der Blockade des cytosolischen Proteinsynthesesystems durch Cycloheximid als auch in vitro an isolierten Mitochondrien durchgeführt. Zuerst wurden die Translationsprodukte auf der Ebene der Ribosomen durch elektrophoretische und chromatographische Methoden charakterisiert. Sodann dienten Pulslabelling-Experimente mit intakten Neurospora-Zellen und anschließende gelelektrophoretische Analyse der mitochondrialen Membranen zur Untersuchung des Schicksals der Translationsprodukte nach dem Ablösen von den mitochondrialen Ribosomen.
Im Vergleich mit dem extramitochondrialen Proteinsyntheseapparat (für den sich in der einschlägigen Literatur die auch hier verwendete Bezeichnung "cytosolisch" eingebürgert hat) zeigt der mitochondriale Prozess wesentliche Unterschiede. Die Untersuchungen führen zu einer Arbeitshypothese, welche dem mitochondrialen Monosom die Eigenschaft eines Transportribosomes zuerkennt.

2. ERGEBNISSE

2.1. c- und m-Ribosomen

Im folgenden bezeichne ich die extramitochondrialen als c-Ribosomen und die mitochondrial lokalisierten als m-Ribosomen.

In diesem Kapitel werden zunächst die c- und m-Ribosomen mit anhängenden radioaktiv markierten Peptidketten durch Zentrifugation im Saccharosegradienten charakterisiert (2.2.1.). Diese Befunde dienen als Grundlage für die weiteren Untersuchungen über die Stabilität gegenüber Ribonuclease- und Temperaturbehandlung (2.1.2. und 2.1.3.). Weiterhin wird nach Pulsmarkierung von Neurospora-Zellen in Anwesenheit und Abwesenheit von Cycloheximid die an den m-Ribosomen bzw. c-Ribosomen nachweisbare Radioaktivität durch Behandlung der Ribosomen in einem zellfreien System mit Puromycin abgelöst (2.1.4.). Danach befindet sich keine Radioaktivität mehr an den Ribosomen. Dies ist ein Beweis dafür, daß bei den angewendeten Verfahren zur Markierung der Translationsprodukte an den c- und m-Ribosomen, nur die Translationsprodukte etikettiert werden. Neben unterschiedlichen Eigenschaften der mit Translationsprodukten beladenen Polysomen und Monosomen wird eine ungewöhnliche Aggregationsneigung des Produktes der m-Ribosomen, im besonderen nach dem Ablösen, beobachtet.

2.1.1. c- und m-Ribosomen mit anhängenden markierten Peptidketten im Saccharosedichtegradienten

Durch Kurzzeitmarkierung von Neurospora-Zellen (45 sec) in Abwesenheit von Inhibitoren kann erreicht werden, daß überwiegend die den c-Ribosomen anhängenden naszierenden

Peptidketten radioaktiv markiert werden, nicht die ribosomalen Strukturproteine. In Abbildung 1 ist das Saccharosedichtegradientenprofil der c-Ribosomen aus derart markierten Zellen dargestellt.

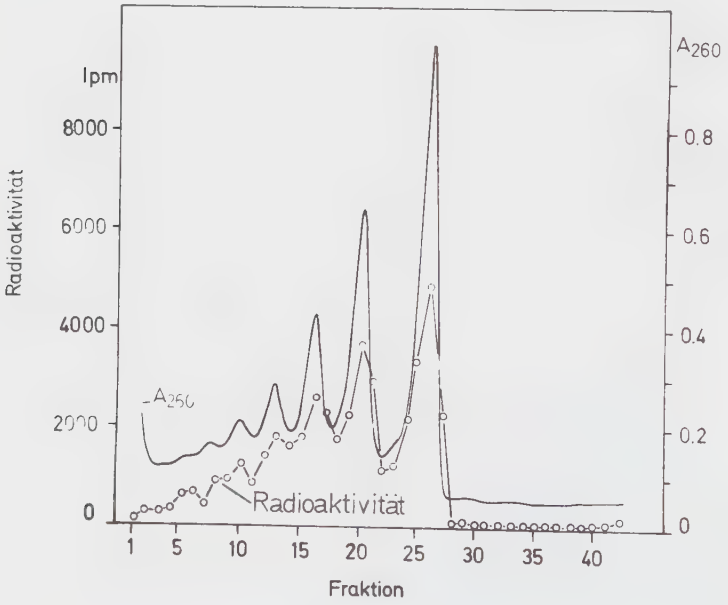


Abb. 1

Saccharosedichtegradientenprofil von c-Ribosomen isoliert aus pulsmarkierten Zellen von Neurospora crassa. Ganze Zellen wurden 45 sec mit tritiertem Leucin inkubiert. Die Radioaktivität in den Gradientenfraktionen repräsentiert den Ribosomen anhängende naszierende Peptidketten.

Die optische Dichte (A_{260}-Definition siehe 4.2.1.) in den einzelnen Gradientenfraktionen zeigt die Anwesenheit von Monosomen und Polysomen[+] (Di-, Tri- und Tetrasomen usw.). Große und kleine Untereinheiten der Ribosomen treten nicht auf. Die Radioaktivität ist über Polysomen und Monosomen verteilt. Wichtig ist zu sehen, daß die spezifische Radioaktivität (Ipm/A_{260}) in Polysomen- und Monosomenfraktionen gleich ist.

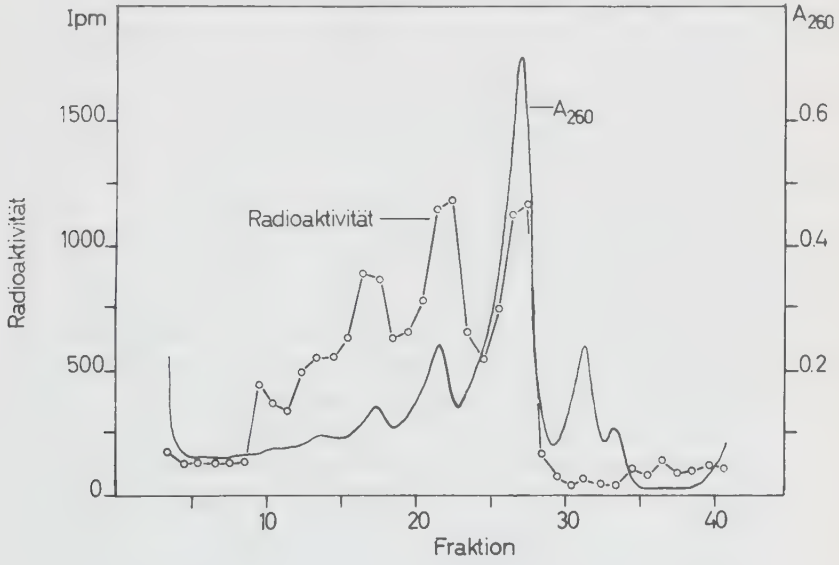


Abb. 2

Saccharosedichtegradientenprofil von m-Ribosomen, die aus Zellen isoliert wurden, in die unter dem Einfluß von Cycloheximid radioaktives Leucin eingebaut wurde. Die Radioaktivität repräsentiert den m-Ribosomen anhängende nascierende Peptidketten.

[+]) Die Bezeichnung Polysomen (=polymere Ribosomen) wird für die durch höhere s-Werte ausgezeichneten Gipfel im Gradienten verwendet.

In Abbildung 2 ist das Saccharosedichtegradientenprofil von m-Ribosomen dargestellt, die aus Zellen isoliert wurden, in welchen das Produkt der mitochondrialen Proteinsynthese unter dem Einfluß von Cycloheximid spezifisch markiert worden ist. Zur Gewinnung der m-Ribosomen wurden die Mitochondrien isoliert, mit 1 % Triton X-100 lysiert und aus dem Lysat durch Zentrifugation (2 Stunden 144000 x g) die Ribosomenfraktion abgetrennt. Die optische Dichte (A_{260}) zeigt die Anwesenheit von Mono-, Di-, Tri- und Tetrasomen, sowie die Anwesenheit von großer und kleiner Untereinheit. Die Radioaktivität ist über Polysomen und Monosomen verteilt. Die spezifische Radioaktivität in den Gradientenfraktionen ist nicht konstant. In den Polysomenfraktionen ist sie ca. 5-10 mal größer als in den Monosomenfraktionen.
Die mit m- und c-Ribosomen assoziierte Radioaktivität repräsentiert wie bereits erwähnt naszierende Peptidketten. Dies kann wie folgt nachgewiesen werden:
Das zur Transfer-RNS analoge Antibiotikum Puromycin bewirkt durch Eingriff in den Translationsprozess, daß im Synthesezustand befindliche Peptide in Form von Peptidyl-Puromycin von den Ribosomen abgelöst werden (14, 15). Inkubiert man Hyphen nach der Pulsmarkierungsperiode (45 sec) mit Puromycin, so befindet sich gegenüber der Kontrolle nur noch 20 % der Radioaktivität an den c-Ribosomen. Zur Ablösung der mit m-Ribosomen assoziierten Peptidketten werden vor der Isolierung der m-Ribosomen die Mitochondrien in einem für die Proteinsynthese optimalen Medium (siehe 4.6.2.) mit dem Antibiotikum inkubiert. Keine Radioaktivität läßt sich in den Gradientenfraktionen nachweisen. Die naszierenden Peptidketten werden vollständig abgelöst (vergl. dazu 2.1.4.)

m- und c-Ribosomen zeigen verschiedene Aggregationsneigung. Die c-Ribosomen lassen sich nach Abtrennung aus dem Zellhomogenat leicht resuspendieren. Die auf den Gradienten aufgetragene Menge findet sich nach Gradientenzentrifugation vollständig in den Gradientenfraktionen. Dies gilt für die optische Dichte, als auch für die Radioaktivität.

Im Gegensatz zu c-Ribosomen lassen sich m-Ribosomen niemals vollständig resuspendieren. Es ist schwierig den Verlust an Ribosomen bei diesem Vorgang quantitativ zu bestimmen, weil bei der Sedimentation der Ribosomen aus dem Mitochondrienlysat Membranmaterial mitsamt den m-Ribosomen abzentrifugiert wird. Eine grobe Bestimmung dieser Verluste beim Resuspendieren ergibt folgende Werte: ca. 20 % der m-Ribosomen lassen sich nach diesem Schritt durch Zentrifugation bei niedrigen g-Werten (3 min, 7000 x g) abtrennen. In dem resultierenden Pellet finden sich ca. 30 % der mit der rohen Ribosomenfraktion assoziierten Radioaktivität. Weiterhin finden sich ca. 40 - 50 % der Radioaktivität und ca. 20 % der optischen Dichte, die auf den Dichtegradienten aufgetragen wurde, nach der Zentrifugation im Pellet des Gradienten wieder. 10 - 20 % der auf den Gradienten aufgetragenen Radioaktivität assoziiert mit der Wand des Zentrifugenbechers. Werden die naszierenden Peptidketten durch Inkubation isolierter Mitochondrien mit Puromycin abgelöst, so ist eine starke Verminderung der Aggregationsneigung der Ribosomen zu beobachten. Bei dem Resuspendieren der m-Ribosomen vermindert sich der Anteil der abzentrifugierbaren Aggregate gegenüber der Kontrolle um die Hälfte. Ebenfalls stark vermindert werden die Verluste bei der Gradientenzentrifugation. Im Vergleich zur Kontrolle befinden sich nur etwa 10 % der aufgetragenen Ribosomen im Pellet des Gradienten.

Diese Beobachtungen demonstrieren die ungewöhnliche Aggregationsneigung der m-Ribosomen. Sie ist offensichtlich besonders stark, wenn die Ribosomen naszierende Peptidketten tragen.

2.1.2. Behandlung der c- und m-Ribosomen mit Ribonuclease in verschiedenen Konzentrationen

Die den c-Ribosomen anhängenden naszierenden Peptidketten wurden mit radioaktiven Aminosäuren markiert. Nach Behandlung der Ribosomen in AMT-Puffer mit verschiedenen Ribonuclease-Konzentrationen wurden die Ribosomen in einem Saccharosedichtegradienten zentrifugiert, und die Radioaktivität bzw. die optische Dichte bei 260 nm in den einzelnen Gradientenfraktionen bestimmt.
Wie aus Abbildung 3 A, B, C zu ersehen ist, nehmen die Polysomen mit zunehmender RNase-Konzentration ab, während das Monosom auf Kosten der Polysomen dementsprechend zunimmt. Dies ist bezüglich der Radioaktivität als auch der optischen Dichte zu beobachten. Keine freien Untereinheiten treten auf.
Im Fall der m-Ribosomen dagegen (Abb. 3 D, E, F) zeigt das hier in vergleichbaren Konzentrationen angewendete Enzym keine Wirkung. Weder Polysomen noch Monosomen werden zerstört. Kleine und große Untereinheiten, die im Falle der m-Ribosomen im Gegensatz zu den c-Ribosomen in einem konstanten Verhältnis auftreten, werden bei Anwendung hoher Enzymkonzentrationen zerstört.

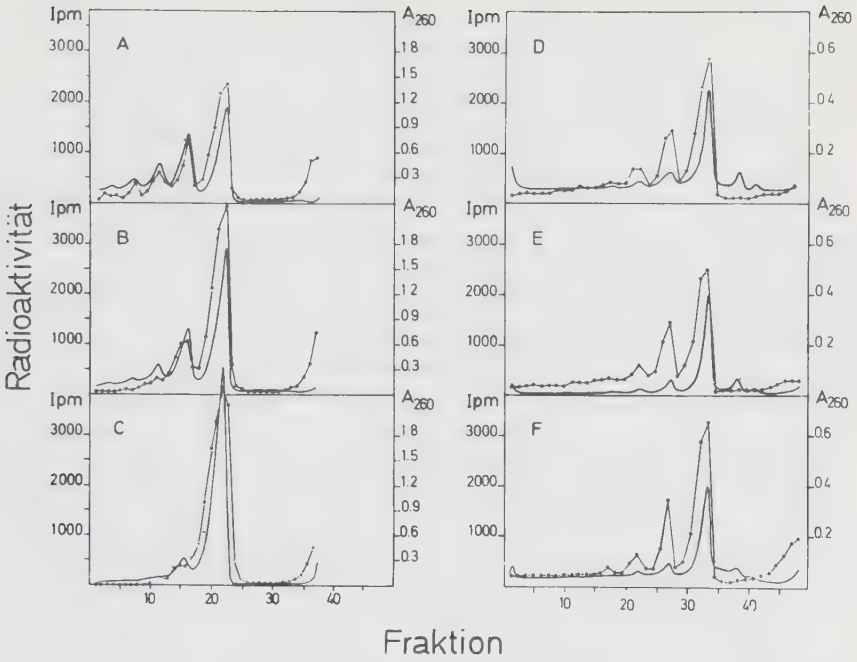


Abb. 3

Behandlung von c- und m-Ribosomen mit Ribonuclease:

A,B,C: c-Ribosomen, D, E, F: m-Ribosomen
A, D: Kontrollen (ohne RNase),
B, E: 0,5 ug/ml RNase,
C, F: 20 ug/ml RNase.
A_{260}: ——; Radioaktivität: -•-•-.
Die Ribosomensuspensionen wurden 1 Stunde bei 0°C in Anwesenheit pankreatischer Ribonuclease inkubiert und anschließend auf einem konvexen Saccharosegradienten zentrifugiert.

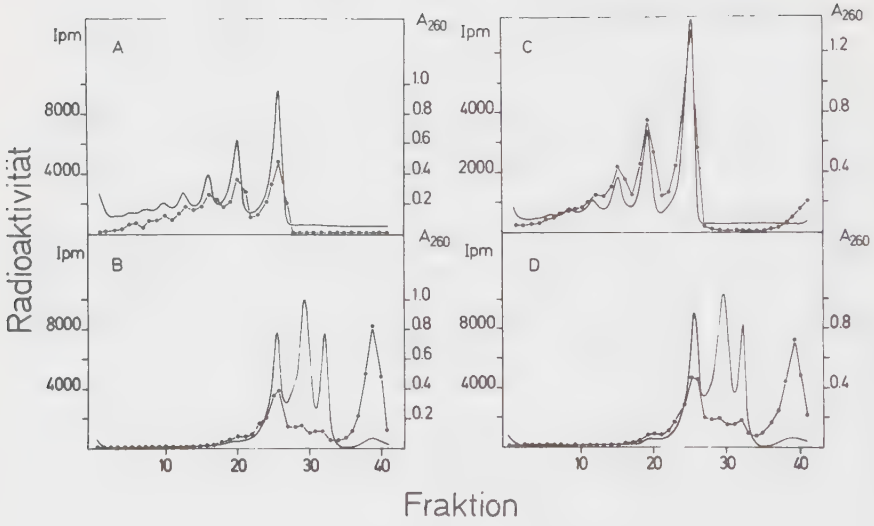


Abb. 4

Thermostabilität von c-Ribosomen:

A: Kontrolle (10 min $0^{o}C$),
B: A, nach Dissoziation der Ribosomen in Untereinheiten,
C: 10 min $32^{o}C$,
D: C, nach Dissoziation der Ribosomen in Untereinheiten.
A_{260}: ——— ; Radioaktivität: -•—•- .
Die Ribosomensuspensionen wurden nach der Behandlung auf einem Saccharosegradienten zentrifugiert. Zur Dissoziation der Ribosomen in Untereinheiten wurden die Proben durch eine magnesiumfreie, EDTA-haltige Schicht (7% Saccharose, 10 mM NH_4Cl, 10 mM Tris-HCl, 1/10 mM EDTA, pH = 7,6) zentrifugiert, die dem Gradienten überschichtet war.

2.1.3. Thermostabilität von c- und m-Ribosomen

In Abbildung 4 A ist die Dichtegradientenanalyse von c-Ribosomen dargestellt. Wiederum weisen Monosomen und Polysomen gleiche spezifische Markierung auf. Werden die Ribosomen in einem Dichtegradienten zentrifugiert, der am Auftrag eine magnesiumfreie, EDTA-haltige Schicht enthält, so dissoziieren sie in 60 s und 40 s Untereinheiten (Abb. 4 B). Der größte Teil der Radioaktivität wird dabei als Peptidyl-Transfer-RNS freigesetzt und erscheint in der magnesiumfreien Schicht, sowohl an der optischen Dichte als auch an der Radioaktivität erkenntlich. Werden die c-Ribosomen vor der Gradientenzentrifugation 10 Minuten bei 37°C gehalten, also unter Bedingungen unter denen die endogene Ribonuclease verstärkt arbeiten kann, so erfolgt, wie von anderen Systemen her bekannt (16), eine Zerstörung von Polysomen (Abb. 4 C). Hier wurden gleiche Mengen an Ribosomen wie in Abbildung 4 A und 4 B aufgetragen. Man beobachtet eine Zunahme der Monosomen auf Kosten der höheren Polysomen. Die spezifische Radioaktivität in Polysomen- und Monosomenfraktionen bleibt dabei konstant. Nach Dissoziation in Untereinheiten (Abb. 4 D) erfolgt wiederum die Freisetzung der Peptidyl-Transfer-RNS.
Die gleichen Untersuchungen wurden mit m-Ribosomen angestellt. Die spezifische Markierung der anhängenden Peptidketten wurde durch Pulsmarkierung von Neurospora-Zellen in Gegenwart von Cycloheximid erreicht. In Abbildung 5 A ist die Dichtegradientenzentrifugation von m-Ribosomen aus derart markierten Zellen dargestellt. In der optischen Dichte tritt hauptsächlich das Monosom in Erscheinung, Disom und Trisom sind verglichen mit c-Ribosomen in wesentlich geringerem Anteil vorhanden. Im Gegensatz zu c-Ribosomen beobachtet man auch einen konstanten

Anteil an 50 s und 37 s Untereinheiten. Radioaktiv markierte Peptidketten befinden sich an Polysomen und Monosomen wie bei den c-Ribosomen. Wie bereits erwähnt ist die spezifische Radioaktivität von Monosomen und Polysomen hier jedoch stark unterschiedlich. Sie ist in Disomen- und Trisomenfraktionen 5-10 mal höher als in den Monosomenfraktionen. Auch durch Magnesiumentzug kann man die m-Ribosomen zerlegen (Abb. 5 B). Die Polysomen werden vollständig zerlegt, die Monosomen weitgehend. Im Gegensatz zu den c-Ribosomen jedoch wird gegenüber der Kontrolle (Abb. 5 A) keine Radioaktivität freigesetzt. Die Radioaktivität befindet sich weiterhin im Gradienten und zwar teilweise an der großen Untereinheit, zum größten Teil aber läßt sie sich nicht mehr zuordnen; möglicherweise handelt es sich um aggregierte große Untereinheiten. Dieser Versuch wurde bei $0^{o}C$ durchgeführt.
Werden die Ribosomen 10 Minuten bei $37^{o}C$ gehalten, dann wird folgendes beobachtet (Abb. 5 C und 5 D): Wie Abbildung 5 C zeigt, verschwinden die Polysomen, das Monosom nimmt um 10 - 40 % ab. Untereinheiten entstehen, jedoch nicht in äquivalenten Verhältnissen. Interessant ist nun das Verhalten der Radioaktivität. Diejenige über den Polysomen verschwindet weitgehend, diejenige über den Monosomen bleibt weitgehend erhalten. Die gegenüber der Kontrolle verschwindende Radioaktivität findet sich nicht am Auftrag des Gradienten wieder, sondern im Sediment (nicht dargestellt). Ein geringer Teil assoziiert mit der Wand des Zentrifugenbechers. Werden die Ribosomen dissoziiert, so findet sich wieder ein geringer Teil an der großen Untereinheit und der größere im Gradienten an nicht zuordenbarer Stelle. Keine Peptidyl-Transfer-RNS erscheint am Auftrag des Gradienten. Die Abnahme der mit mitochondrialen Monosomen und Polysomen assoziierten Radioaktivität (= naszierende Peptidketten) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bei $32^{o}C$ ist in Abbildung 6 darge-

stellt. Die mit den monomeren Ribosomen assoziierte Radioaktivität bleibt gegenüber der mit den polymeren Formen der Ribosomen assoziierten weitaus stabiler an das Monosom gebunden.

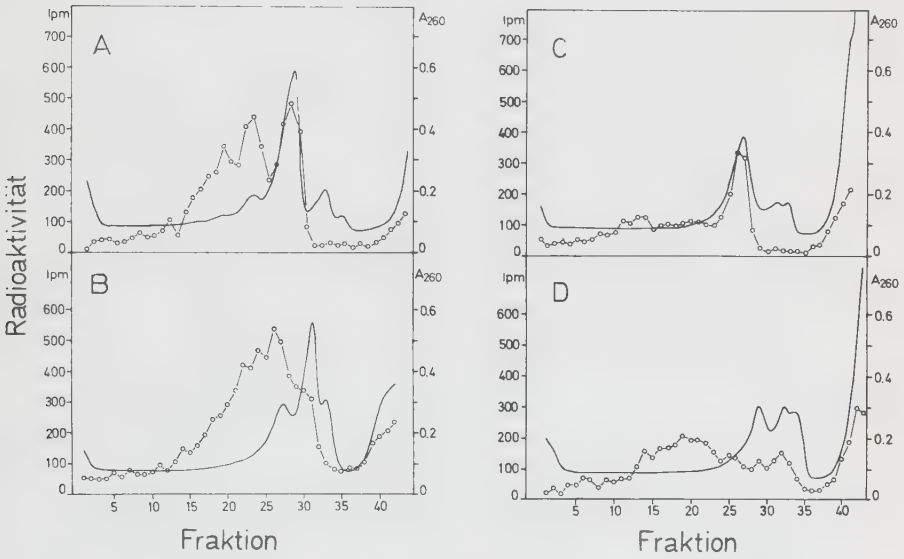


Abb. 5

Thermostabilität von m-Ribosomen:

A: Kontrolle (10 min 0°C),
B: A, nach Dissoziation der Ribosomen in Untereinheiten,
C: 10 min 32°C,
D: C, nach Dissoziation der Ribosomen in Untereinheiten.
A_{260}: ——— ; Radioaktivität: -o—o— .
Aliquote einer Ribosomensuspension wurden nach 10-minütiger Behandlung bei 0°C bzw. 32°C in einem Saccharosegradienten zentrifugiert. Die Dissoziation der Ribosomen in Untereinheiten wurde wie für die c-Ribosomen beschrieben durchgeführt (vergl. Legende zu Abb. 4).

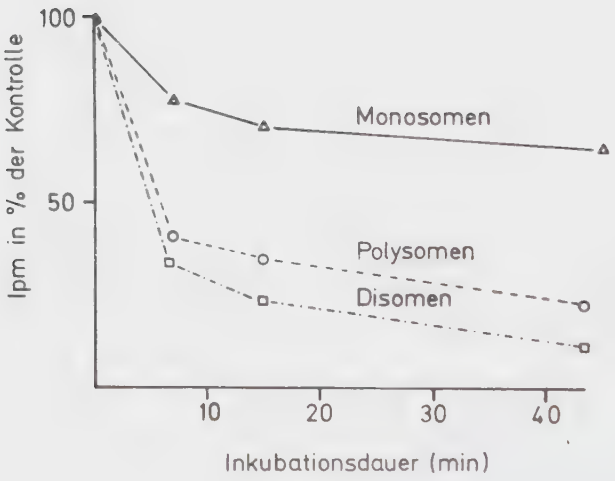


Abb. 6

Abnahme der mit mitochondrialen Monosomen und Polysomen assoziierten Radioaktivität in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bei 32°C:
m-Ribosomen wurden dazu in AMT-Puffer suspendiert und verschieden lang bei 32°C inkubiert. Nach Saccharosedichtegradientenzentrifugation aliquoter Mengen wurde die mit den monomeren und polymeren Formen der Ribosomen assoziierte Radioaktivität bestimmt. 100 % entspricht der Radioaktivität, die bei nicht behandelten Ribosomen in Mono-, Di- und Polysomenfraktionen zu finden ist.

2.1.4. Ablösen der den c- und m-Ribosomen anhängenden naszierenden Peptidketten mit Puromycin in einem zellfreien System.

Die den c-Ribosomen anhängenden naszierenden Peptidketten wurden durch Pulsmarkierung von Neurospora-Zellen radioaktiv markiert (Abb. 7 A), und durch Behandlung der Ribosomen aus derart markierten Zellen die Radioaktivität von den Ribosomen getrennt. Das heißt, nach Inkubation der c-Ribosomen unter optimalen Bedingungen (10 min 32°C mit 0,5 mM Puromycin, 0,5 mM GTP und cytosolischen G-Faktoren, vergl. 4.8.) und anschließender Gradientenzentrifugation findet sich die Radioaktivität in Form von Peptidyl-Puromycin am Auftrag des Gradienten (Abb. 7 B). Der Anstieg der optischen Dichte in den Top-Fraktionen des Gradienten repräsentiert im wesentlichen freies Puromycin. Abbildung 7 C gibt nochmals zum Vergleich die bereits beschriebene Ablösung (2.1.3.) bei der Dissoziation in Untereinheiten wieder.
Zur Ablösung der mit m-Ribosomen assoziierten Radioaktivität wurde wie folgt verfahren (Abb. 8 A bis Abb. 8 D):
Die Translationsprodukte der Mitochondrien wurden zu diesem Versuch unter dem Einfluß von Cycloheximid mit tritiertem Leucin markiert. Nach Isolierung der mitochondrialen Ribosomen und Resuspendieren in AMT-Puffer (10 mM Mg^{++}), wurden aliquote Mengen wie folgt inkubiert und sodann einer Dichtegradientenzentrifugation unterzogen:

1. Mit Puromycin
2. Mit Puromycin, GTP und löslichen Matrixproteinen (enthaltend den mitochondrialen G-Faktor).
3. Nach Behandlung wie in 2. einer Zentrifugation unter dissoziierenden Bedingungen unterworfen.

Als Kontrolle diente die Ribosomensuspension, die bei 0°C gehalten wurde (Abb. 8 A).

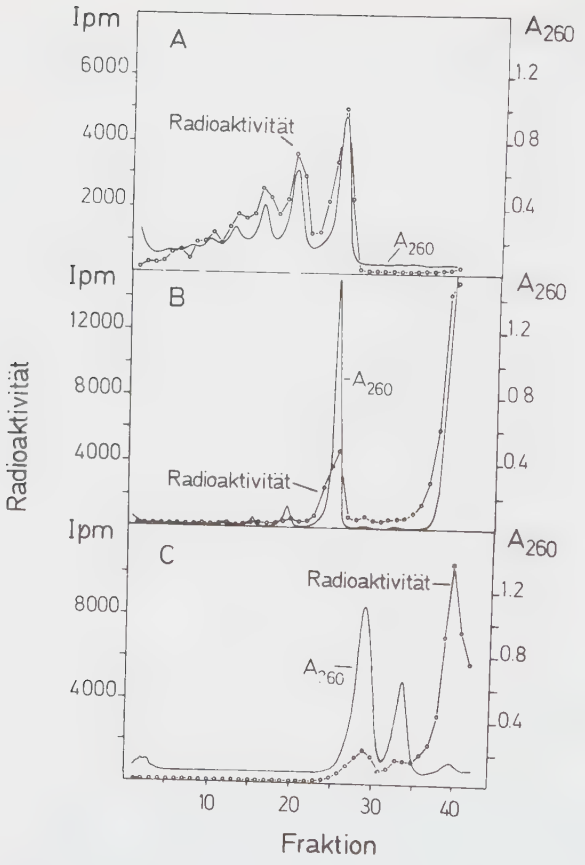


Abb. 7

Saccharosedichtegradientenzentrifugation von c-Ribosomen vor und nach Behandlung der Ribosomen mit Puromycin in einem zellfreien System und Dissoziation in Untereinheiten: Gleiche Mengen Ribosomen aus mit ^{3}H-Leucin pulsmarkierten Zellen wurden

A: 10 min bei 32°C,

B: 10 min bei 32°C mit Puromycin, GTP und cytosolischen G-Faktoren inkubiert,

C: 10 min bei 32°C gehalten und anschließend in Untereinheiten zerlegt (vergl. 2.1.3.).

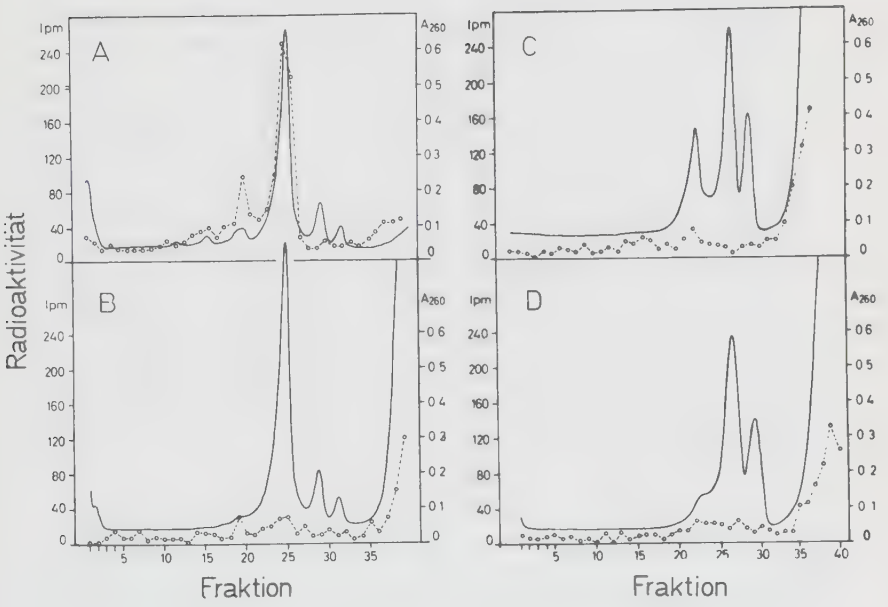


Abb. 8

Saccharosedichtegradientenzentrifugation von m-Ribosomen:

A: Kontrolle (10 min 0°C),
B: 0,5 mM Puromycin 10 min bei 32°C,
C: 0,5 mM Puromycin, GTP und mitochondrialer G-Faktor 10 min bei 32°C,
D: C nach Dissoziation der Ribosomen in Untereinheiten.
A_{260}: ——— ; Radioaktivität: -o—o— .

Die den Ribosomen anhängenden Peptidketten wurden durch Inkubation ganzer Zellen mit radioaktiven Aminosäuren in Gegenwart von Cycloheximid markiert. Zur Dissoziation der Ribosomen in Untereinheiten wurden die Ribosomen durch eine magnesiumfreie, EDTA-haltige Schicht zentrifugiert, die dem Gradienten überlagert war.

Nach Analyse der Gradienten bezüglich der optischen Dichte und der Radioaktivität in den Gradientenfraktionen ergaben sich in den erwähnten Fällen folgende Ergebnisse: Nach Behandlung mit Puromycin (Abb. 8 B) nimmt der Monosomengipfel im Profil der optischen Dichte (A_{260}) zu, und zwar auf Kosten der Polysomen. Wird zusätzlich noch lösliches Matrixprotein zugesetzt, so zerfallen Polysomen als auch Monosomen in Untereinheiten (Abb. 8 C). Zentrifugiert man die so behandelte Probe zusätzlich durch eine EDTA-haltige Schicht, so bewirkt dies eine vollständigere Dissoziation in Untereinheiten (Abb. 8 D).
Die Radioaktivität ist in allen Fällen von den Ribosomen abgelöst worden. Sie findet sich nur zu einem geringen Teil am Auftrag, größtenteils im Sediment des Gradienten wieder. Ein Teil assoziiert auch mit der Wand des Zentrifugenbechers.

2.2. Charakterisierung der Translationsprodukte an den m-Ribosomen

In diesem Kapitel werden zunächst die an den m-Ribosomen befindlichen Peptide mit Hilfe zweier analytischer Methoden, der Gelchromatographie und der Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, charakterisiert. Diese Peptide wurden durch Einbau von radioaktiven Aminosäuren entweder in isolierte Mitochondrien (in vitro) oder in ganze Hyphen in Gegenwart von Cycloheximid (in vivo - plus CHX) markiert. Anschließend wird der Nachweis geführt, daß auch nach in vivo-Markierung, d.h. ohne Einfluß von Cycloheximid, also unter natürlichen Verhältnissen, an den m-Ribosomen die gleichen Produkte synthetisiert werden. In allen Experimenten wurden zur Verhinderung der Aggregation SDS-haltige Medien verwendet. Zunächst beschäftige ich mich mit der gelchromatographischen Analyse vor und nach Behandlung mit Trypsin.

2.2.1. Gelchromatographische Analyse der in vivo in Anwesenheit von Cycloheximid und in vitro spezifisch markierten Translationsprodukte vor und nach enzymatischer Spaltung mit Trypsin.

Die Ribosomen mitsamt dem anhängenden Produkt wurden durch Zentrifugation (2 Stunden 144000 x g) aus den Gradientenfraktionen isoliert. Diese Präparation - z.B. die Fraktionen 5 - 27 aus Abbildung 2 - wurde in detergenzhaltigem Puffer (1 % SDS, 0,1 M Tris-HCl) bei pH = 8 gelöst. Die zweistündige Behandlung in diesem Medium bei 37°C zerlegt die Ribosomen in einzelne Bestandteile, setzt die neusynthetisierten Peptidketten frei und bewirkt zumindest teilweise eine Spaltung der Esterbindung zwischen neu entstandenem Peptid und der Transfer-RNS. Dieser Ansatz wird ohne weiteres auf die Chromatographiesäule aufgetragen.
Wie Abbildung 9 zeigt, erscheint bei Verwendung von Sephadex G 200 die Radioaktivität des in vitro markierten Produkts in einem einzigen Gipfel, in einem Elutionsvolumen, das dem Molekulargewicht des Cytochrom c (11600) entspricht; dieselben Verhältnisse findet man, wenn das in vivo plus CHX synthetisierte Produkt unter gleichen Bedingungen chromatographiert wird. Keine niedermolekularen Substanzen treten auf; das heißt, in Elutionsvolumina, die kleinen Molekulargewichten entsprechen, befindet sich keine Radioaktivität.

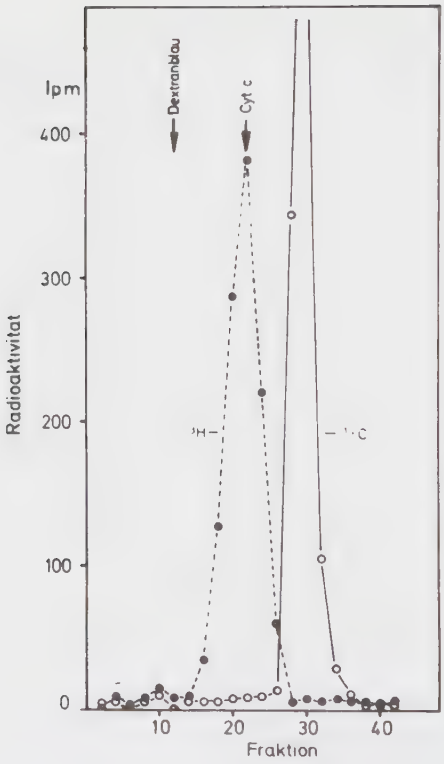


Abb. 9

Gelchromatographische Analyse des in vitro mit ^{3}H-Leucin markierten Produktes der mitochondrialen Proteinsynthese auf Sephadex G 200. Die Fraktionen, in welchen die Eichsubstanzen Dextranblau (MG 1-5x10^{6}) und Cytochrom c (MG 11600) eluiert werden, sind markiert. Leucin wird in Form der ^{14}C-Verbindung als Eichsubstanz verwendet.

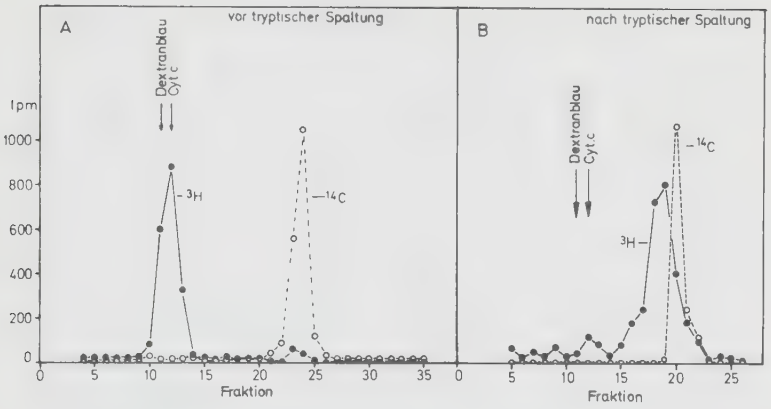


Abb. 10

Gelchromatographische Analyse des in vitro mit ^{3}H-Leucin markierten Produktes der mitochondrialen Proteinsynthese auf Bio-Gel P 30 vor (A) und nach (B) tryptischer Spaltung. Als Eichsubstanzen dienten Dextranblau, Cytochrom c und ^{14}C-Leucin.

Abbildung 10 stellt die entsprechende Chromatographie auf Bio-Gel P 30 dar. Abbildung 10 A vor und Abbildung 10 B nach tryptischer Spaltung. Das Produkt, das zu diesem Experiment in vitro mit tritiertem Leucin markiert wurde, wird nach tryptischer Spaltung (1 % Trypsin) in einem Elutionsvolumen nachgewiesen, das sehr viel kleineren Molekulargewichten entspricht. Das gleiche Verhalten zeigte das in vivo unter dem Einfluß von Cycloheximid synthetisierte Produkt. Vor tryptischer Spaltung wird die Radioaktivität zusammen mit Cytochrom c eluiert. Durch Behandlung mit Trypsin entstehen Bruchstücke mit sehr viel kleineren Molekulargewichten, die sich auf Bio-Gel P 30 von den intakten Produkten trennen lassen.

2.2.2. Gelelektrophoretische Analyse der spezifisch markierten Translationsprodukte von Mitochondrien.

Mit Hilfe eines Elektrophoresesystems in saurem Medium (Phenol-Eisessig-Wasser) (siehe SEBALD et al. (17)) gelang keine Auftrennung. Das Produkt, das nach gelchromatographischer Analyse auf Sephadex G 200 Molekulargewichte von ca. 11000 aufweist, zeigt nach gelelektrophoretischer Analyse bei saurem pH eine breite Verteilung, welche keine Differenzierung spezieller Banden erlaubt. Deshalb wurde ein anderes Verfahren eingesetzt.
Bei alkalischem pH in Anwesenheit von Detergenzien (SDS) konnte mit der von WEBER et al. (18) beschriebenen Methode eine die Untersuchungen weiterführende Auftrennung erzielt werden. Natriumdodecylsulfat (SDS) umhüllt bekanntlich ein Proteinmolekül in der Weise, daß sein unpolarer Rest an das Proteinmolekül gebunden wird, während der polare Teil nach außen, also zum Wasser hin ausgerichtet ist. Das bedeutet, die Ladung der Proteinmoleküle wird abgeschirmt, nach außen hin erscheint nur die Ladung des Detergenz. Erfolgt die Auftrennung in einem Polyacrylamid-Gel, so werden die Moleküle je nach ihrer Größe mehr oder weniger im Maschenwerk des Gels zurückgehalten. Für Sphäroproteine hat die Erfahrung gezeigt, daß der Logerithmus der Molekulargewichte proportional der Laufstrecke des Moleküls auf dem Gel ist (18).
Die Ribosomen mitsamt dem anhängenden Produkt wurden analog der Vorbehandlung zur Säulenchromatographie in detergenzhaltigem Medium gelöst und anschließend zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Nur bei exakter Einhaltung dieser Vorbehandlungsbedingungen waren reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen.
Die SDS-gelelektrophoretische Analyse des <u>in vitro</u> synthetisierten Produktes ist in Abbildung 11 dargestellt, des <u>in vivo</u> unter dem Einfluß von Cycloheximid synthetisierten in Abbildung 12.

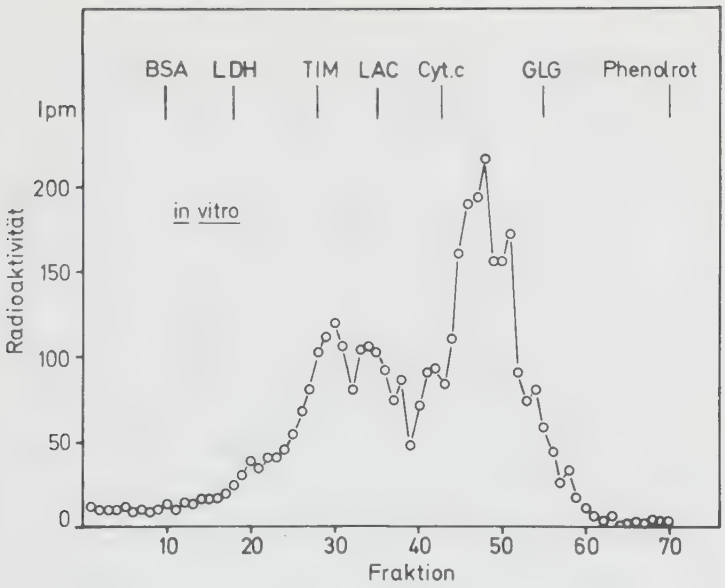


Abb. 11
Gelelektrophoretische Analyse des in vitro synthetisierten Produktes der mitochondrialen Proteinsynthese

In beiden Fällen findet man im wesentlichen die gleiche Radioaktivitätsverteilung. Auf einem breiten Untergrund (Molekulargewichte von ca. 5000 - 40000) befinden sich Radioaktivitätsgipfel, denen auf Grund der Eichung mit Sphäroproteinen (BSA, LDH usw.; Abkürzungen siehe 4.10.) scheinbare Molekulargewichte von 27000, 18000 und 5000 - 10000 zugeordnet werden.

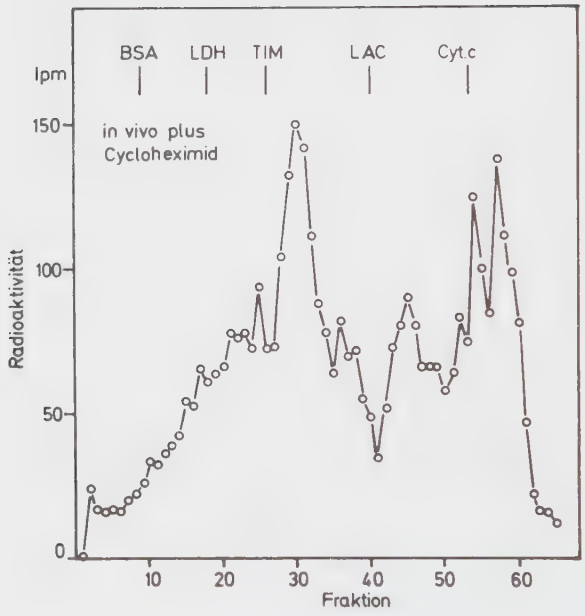


Abb. 12

Gelelektrophoretische Analyse des in vivo unter dem Einfluß von Cycloheximid synthetisierten Produktes der mitochondrialen Proteinsynthese.

2.2.3. Gelelektrophoretische Analyse der ohne Inhibitoreinfluß an den m-Ribosomen synthetisierten Translationsprodukte von Mitochondrien.

Vorbemerkungen zu diesen Experimenten:
Werden in Neurospora-Zellen in Gegenwart von Cycloheximid oder in isolierte Mitochondrien radioaktive Aminosäuren eingebaut, so erfolgt nur die Markierung der mitochondrialen

Translationsprodukte. Das heißt, in vitro und in vivo unter dem Einfluß von Cycloheximid wird das extramitochondriale Proteinsynthesesystem daran gehindert, seinen Beitrag zur Biogenese der Mitochondrien zu leisten. Möglicherweise werden jedoch unter den genannten Bedingungen die biochemischen Vorgänge innerhalb der Mitochondrien, die mit der cytosolischen Proteinsynthese eng in Zusammenhang stehen, beeinträchtigt. Dann würden Produkte synthetisiert werden, die mit den natürlich gebildeten (ohne Trennung des inneren und äußeren Systems) nicht identisch sind. Obwohl viele Befunde darauf hinweisen, daß zwischen dem cytosolischen und dem mitochondrialen Proteinsynthesesystem keine strenge Kopplung besteht (19, 20, 21), konnte eine gegenseitige Beeinflussung mit Auswirkung auf die Qualität der Translationsprodukte nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde der folgende Versuch durchgeführt, mit dem gezeigt wird, daß das unter natürlichen Bedingungen synthetisierte Produkt identisch ist mit dem in vitro und in vivo unter dem Einfluß von Cycloheximid synthetisierten.
Baut man radioaktive Aminosäuren in Hyphen ein, so werden sowohl die Ribosomenproteine als auch die den Ribosomen anhängenden Peptidketten markiert. Um zwischen beiden Markierungsprozessen unterscheiden zu können, wurde analog zu 2.1.1. zunächst von der Vorstellung ausgegangen, daß in einer kurzen Pulsmarkierungsperiode vorwiegend die naszierenden Peptidketten markiert werden, und daß zur Markierung der ribosomalen Strukturproteine eine längere Zeit benötigt wird.

Die Experimente:
Ganze Hyphen wurden eine Stunde mit ^{14}C-Leucin inkubiert. Daran anschließend folgte eine Pulsmarkierungsperiode von 1,5 Minuten mit ^{3}H-Leucin. Um den Aminosäureeinbau zu stoppen, wurde der Versuchsansatz innerhalb von 10 bis

20 Sekunden auf Eistemperatur abgekühlt. Die aus den Hyphen isolierten Mitochondrien wurden geteilt. Aus einem Teil wurden die m-Ribosomen sofort isoliert, aus dem anderen gleichen Teil erst nach einer weiteren Inkubationszeit von 7 Minuten mit Puromycin in einem für die mitochondriale Proteinsynthese optimalen Inkubationsmedium (vergl. 4.6.2.). Die Profile der aus beiden Teilen von Mitochondrien isolierten Ribosomen auf konvexen Gradienten sind in Abbildung 13 dargestellt (ohne Ablösung der naszierenden Peptidketten oben, nach Ablösung unten).

In der Diskriminierung von ^{3}H und ^{14}C zeigt sich, daß die in der Vorbemerkung entwickelte Vorstellung für m-Ribosomen nicht zutrifft. Trotz der Ablösung der naszierenden Peptidketten mit Puromycin (vergl. dazu 2.1.1. und 2.1.4.), stellen sich die Ribosomen gleichermaßen in der ^{3}H- und der ^{14}C-Radioaktivität dar (Abb. 13 B). Daraus ist zu schließen, daß schon innerhalb der Pulsmarkierungsperiode ^{3}H-Leucin in mitochondriale Ribosomenproteine eingebaut worden ist.

Um angesichts dieser Komplikationen den Anteil der ^{3}H-Radioaktivität bestimmen zu können, der die naszierenden Peptidketten allein darstellt, wurde wie folgt weiterverfahren: Die Ribosomen der Gradientenfraktionen 1 bis 23 aus beiden Gradienten (Abb. 13 A und 13 B) wurden abzentrifugiert, unter Standardbedingungen in detergenzhaltigem Puffer gelöst und gelelektrophoretisch analysiert. Das Ergebnis der Analyse der Ribosomen mit anhängenden naszierenden Peptidketten ist in Abbildung 14 dargestellt. Die ^{14}C-Radioaktivität repräsentiert ausschließlich die Molekulargewichtsverteilung der ribosomalen Strukturproteine, die ^{3}H-Radioaktivität stellt die Summe der ^{3}H-Radioaktivität eingebaut in naszierende Peptidketten und eingebaut in ribosomale Strukturproteine dar.

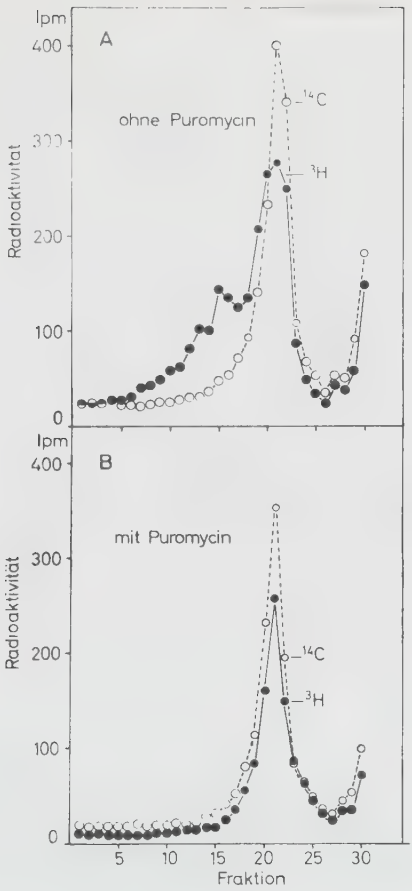


Abb. 13

Saccharosedichtegradientenprofil von m-Ribosomen aus Zellen, die 1 Stunde mit ^{14}C-Leucin (0,03 µCi/ml, 342 mCi/mMol) und durch Pulsmarkierung mit ^{3}H-Leucin (0,5 µCi/ml, 250 mCi/mMol) in vivo markiert wurden:
A: Kontrolle,
B: Ribosomen aus Mitochondrien, die zur Ablösung der naszierenden Peptidketten von den Ribosomen in vitro mit 0,5 mM Puromycin inkubiert wurden.

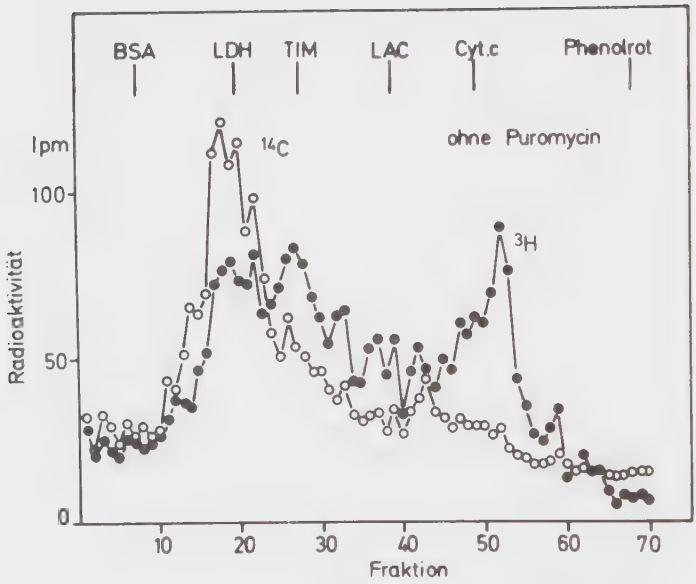


Abb. 14

Gelelektrophoretische Analyse von m-Ribosomen mitsamt den naszierenden Peptiden, isoliert aus Zellen, die eine Stunde mit ^{14}C-Leucin und 1,5 min mit ^{3}H-Leucin markiert wurden.

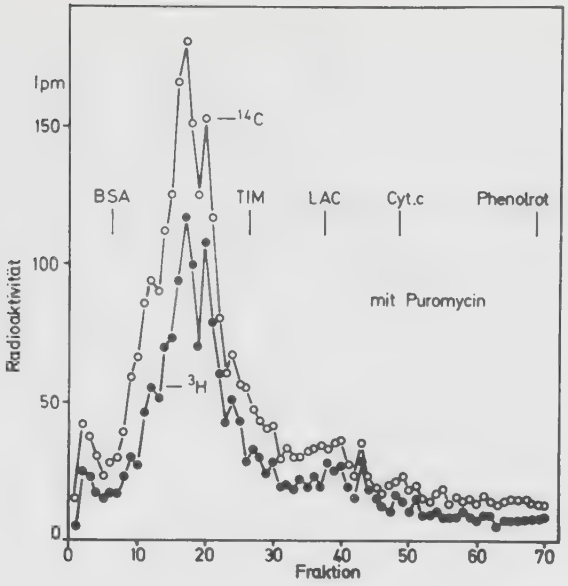


Abb. 15

Gelelektrophoretische Analyse von m-Ribosomen isoliert aus Zellen, die eine Stunde mit ^{14}C-Leucin und 1,5 min mit ^{3}H-Leucin markiert wurden. Vor der Isolierung der m-Ribosomen wurden die Mitochondrien 7 min bei 32°C in einem für die mitochondriale Proteinsynthese optimalen Medium mit 0,5 mM Puromycin inkubiert.

Wie Abbildung 15 zeigt, ist im Falle der Ribosomen aus Puromycin-behandelten Mitochondrien die Verteilung der ^{3}H-Radioaktivität identisch der Verteilung der ^{14}C-Radioaktivität; d.h., das Verhältnis von ^{3}H- zu ^{14}C-Radioaktivität ist in allen Fraktionen konstant. Dieser Befund besagt, daß die ^{3}H-Radioaktivität in dem gleichen Material eingebaut vorliegt, in das während der Lang-

zeitmarkierung (1 Stunde) ^{14}C-Leucin inkorporiert wurde. Daraus kann gefolgert werden, daß die Ribosomen keine naszierenden Peptidketten mehr tragen. Die ^{3}H-Radioaktivität repräsentiert ausschließlich ribosomale Strukturproteine.
Die Ergebnisse der beiden Elektrophoresen, die in den Abbildungen 14 und 15 dargestellt sind, wurden dazu verwendet um die Verteilung der naszierenden Peptidketten auf dem Gel rechnerisch zu ermitteln. Da beide Elektrophoresen unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, läßt sich aus der Differenz der ^{3}H-Radioaktivitäten die ^{3}H-Radioaktivität ermitteln, die der Verteilung der naszierenden Peptidketten entspricht.
Die Berechnung für jede einzelne Fraktion wurde nach der folgenden Beziehung durchgeführt:

$$^{3}\text{H-Ipm}_{-P} - {}^{14}\text{C-Ipm}_{-P} \times \frac{^{3}\text{H-Ipm}_{+P}}{^{14}\text{C-Ipm}_{+P}} = {}^{3}\text{H-Ipm}_{nT}$$

Hierbei stehen die Symbole:

-P : für Markierung ohne nachfolgende Puromycingabe,
+P : für Markierung mit nachfolgender Puromycingabe,
nT : für naszierende Translationsprodukte.

Durch diese Art von Rechnung wurden Fehler ausgeschaltet, die sich daraus ergeben konnten, daß ungleiche Mengen Ribosomen aufgetragen wurden und daß die den Fraktionen entsprechenden Laufstrecken nicht identisch sind. Für das Verhältnis ^{3}H / ^{14}C (mit Puromycin) wurde ein konstanter Wert eingesetzt, der den Mittelwert aus 70 Fraktionen darstellt. Das Ergebnis ist in der Abbildung 16 dargestellt.
Wie bei dem Einbau von radioaktiven Aminosäuren in isolierte Mitochondrien und bei dem Einbau von radioaktiven

Aminosäuren in Neurospora-Zellen in Gegenwart von Cycloheximid, treten nach gelelektrophoretischer Analyse der naszierenden Peptidketten im wesentlichen drei Radioaktivitätsgipfel auf, welchen man die Molekulargewichte 27000, 18000 und 5000 - 10000 zuordnen kann. Die Radioaktivität in Abbildung 16 stellt also die Verteilung des in vivo an den m-Ribosomen befindlichen Produktes der mitochondrialen Proteinsynthese dar.

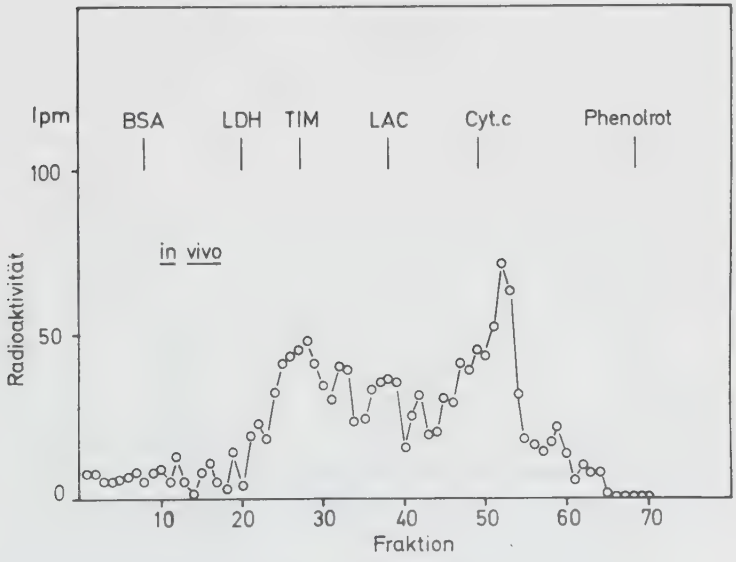


Abb. 16

In vivo synthetisiertes Produkt der mitochondrialen Proteinsynthese an den m-Ribosomen: Die ^{3}H-Radioaktivität, repräsentativ für die den Ribosomen anhängenden Peptidketten, wurde durch Bildung der Differenz der ^{3}H-Radioaktivitäten in den einzelnen Fraktionen der Elektrophoresen, die in den Abbildungen 14 und 15 dargestellt sind, ermittelt.

Die naszierenden Peptidketten konnten durch Behandlung einer Ribosomenlösung mit Phenolmedium nach KIRBY (22) in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat von den Ribosomenproteinen abgetrennt und ebenfalls einer gelelektrophoretischen Analyse unterworfen werden. Bei dem Extraktionsschritt verlassen die ribosomalen Strukturproteine die wässrige Phase, während die naszierenden Peptidketten in Form von stark polarer Peptidyl-Transfer-RNS in der wässrigen Phase verbleiben. Die Verteilung der Radioaktivität weist wiederum drei Gipfel auf, die den Molekulargewichten 27000, 18000 und 5000 - 10000 entsprechen. ^{14}C-Radioaktivität ist keine mehr vorhanden. Dies bestätigt die quantitative Befreiung der naszierenden Peptidketten von ribosomalen Strukturproteinen.

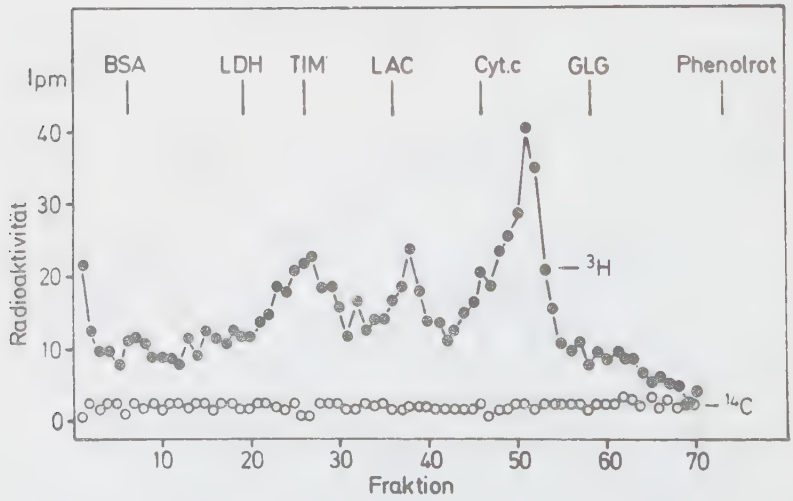


Abb. 17

Gelelektrophoretische Analyse der in vivo synthetisierten naszierenden Peptidketten nach Trennung von ribosomalen Strukturproteinen.

2.3. Getrennte Analyse der den Polysomen und Monosomen anhängenden Translationsprodukte.

Die vorausgehenden Untersuchungen (2.1.) haben einen wesentlichen Unterschied zwischen c- und m-Ribosomen ergeben, und zwar was die Natur der polymeren Ribosomen betrifft. Im Falle der c-Ribosomen konnten die polymeren Formen durch RNase-Einwirkung in die monomeren Formen umgewandelt werden (siehe 2.1.2.). Fernerhin zerfallen die cytosolischen Polyribosomen leicht in Monoribosomen, wenn sie bei 32°C in AMT-Puffer inkubiert werden (siehe 2.1.3.), wahrscheinlich durch die Wirkung einer endogenen Ribonuclease. Dies ist in Übereinstimmung mit der klassischen Vorstellung, daß die Polyribosomen die aktiven Partikel in der Proteinbiosynthese sind, und daß die in Ribosomenpräparationen auftretenden Monoribosomen künstliche Zerfallsprodukte darstellen. Die Translationsprodukte an polymeren und monomeren Ribosomen sollten demnach identisch sein.
Im Gegensatz dazu erweisen sich mitochondriale Ribosomen resistent gegenüber RNase-Einwirkung (siehe 2.1.2.). Weiterhin führt die Inkubation von mitochondrialen Ribosomenpräparationen bei 32°C nicht zu einem Zerfall von Polymeren in die Monomeren, vielmehr aggregieren die Polymeren und das bevorzugt vor den Monomeren (siehe 2.1.3.). Dies führt nicht nur zur Vermutung, daß die Polymeren keine messenger-RNS-Ribosomenkomplexe darstellen, sondern provoziert auch die Frage, ob die den polymeren und monomeren Formen anhängenden Translationsprodukte identisch sind.
In diesem Sinne wurde eine Untersuchung angestellt, in der sowohl für cytosolische als auch mitochondriale Ribosomen die polymeren und monomeren Formen nach Gradientenzentrifugation getrennt wurden. Dies war gefolgt von der

Analyse der anhängenden Peptidketten, und zwar mit den Methoden der Gelchromatographie und der Gelelektrophorese.

2.3.1. Gelchromatographische Analyse der den mitochondrialen Polysomen und Monosomen anhängenden Translationsprodukte.

Polysomen und Monosomen, deren anhängende Peptidketten durch Einbau von radioaktiven Aminosäuren (in vivo plus CHX) radioaktiv markiert waren, wurden aus Dichtegradienten durch Zentrifugation der entsprechenden Fraktionen isoliert. Zur Charakterisierung der anhängenden Peptidketten wurden die Partikel in SDS-haltigem Puffer gelöst, mit Ribonuclease (0,5 mg/ml) versetzt und zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Chromatographie der Proben an Sephadex G 200 erscheint die Radioaktivität in einem einzigen Gipfel (Abb. 18 A und 18 C). In beiden Fällen werden die Peptide zusammen mit Cytochrom c, das als Eichsubstanz den Proben zugegeben wurde, von der Säule eluiert. Sie werden eindeutig von niedermolekularen Komponenten getrennt, wie von Leucin, das in Form der ^{14}C-Verbindung den ^{3}H-markierten Peptiden zugesetzt wurde.
Werden die Ribosomen in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat mit hohen Konzentrationen Trypsin (10 mg/ml) inkubiert, so werden sowohl die mit Monosomen als auch die mit Polysomen assoziierten Peptide gespalten. Wie in den Abbildungen 18 B und 18 D gezeigt, wird der größte Teil der Radioaktivität in beiden Fällen zusammen mit dem Leucin eluiert.
Um einen genaueren Vergleich der Elutionsprofile der mit polymeren und monomeren m-Ribosomen assoziierten Peptidketten zu erreichen, wurde ^{14}C-markiertes Monosomenprodukt zusammen mit ^{3}H-markiertem Polysomenprodukt an Sephadex G 200 chromatographiert (Abb. 19). Der größte Teil (ca. 75 %) der ^{3}H-Radioaktivität (Polysomenprodukt) wird zusammen mit dem Monosomenprodukt (^{14}C-Radioaktivität) eluiert. Ein kleinerer Teil (ca. 25 %) erscheint in Elutionsvolumina, die höheren Molekulargewichten entsprechen.

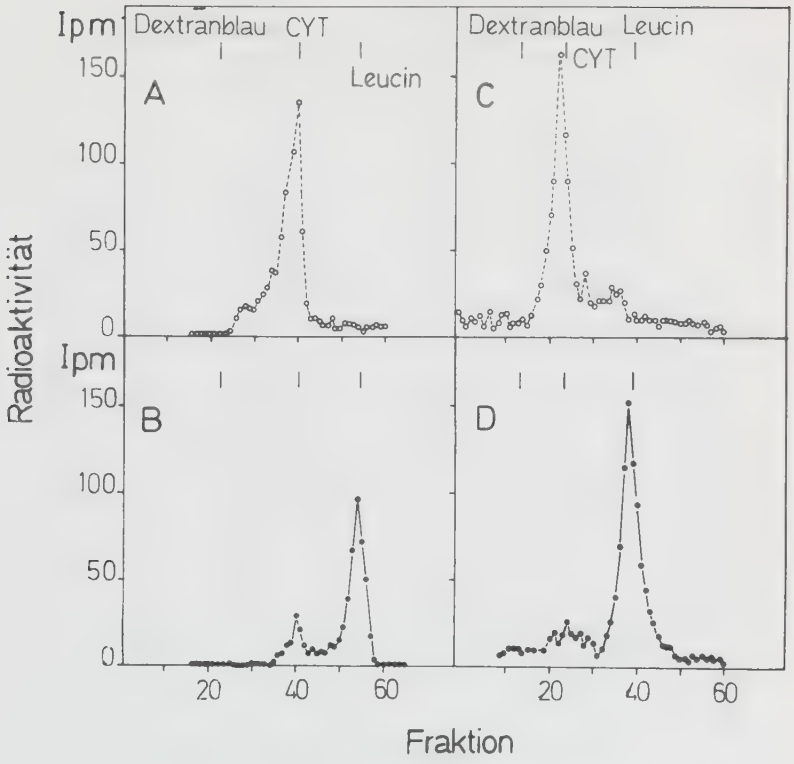


Abb. 18

Gelchromatographische Analyse der <u>in vivo</u> unter dem Einfluß von Cycloheximid ^{3}H-markierten Peptidketten an den polymeren und monomeren m-Ribosomen vor und nach tryptischer Spaltung an Sephadex G 200:
A, B: monomere Ribosomen,
C, D: polymere Ribosomen,
A, C: vor tryptischer Spaltung,
B, D: nach tryptischer Spaltung.
Dextranblau, Cytochrom c und ^{14}C-Leucin dienten als Eichsubstanzen und wurden zusammen mit den Proben auf die Säule aufgetragen.

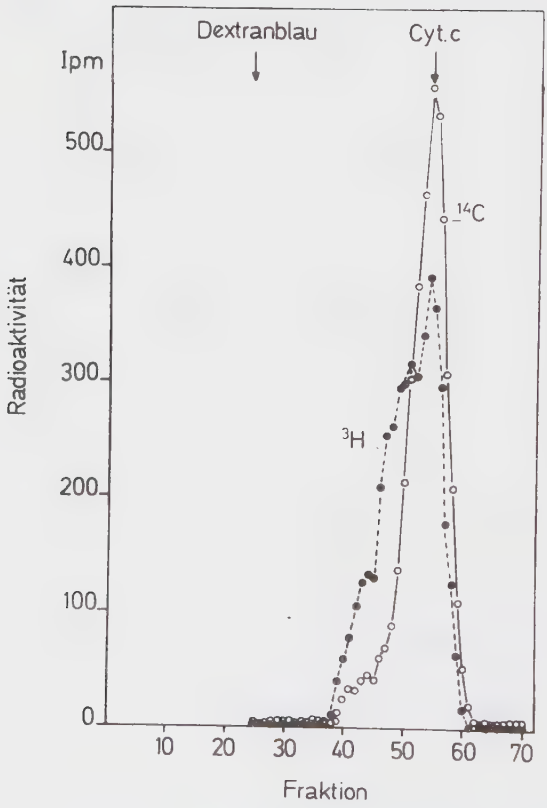


Abb. 19

Cochromatographie von mitochondrialem Polysomen- und Monosomenprodukt an Sephadex G 200:
Die Polysomen wurden aus Zellen isoliert, die mit ^{3}H-Leucin in Gegenwart von Cycloheximid markiert waren, die Monosomen aus Mitochondrien, die durch Einbau von ^{14}C-Leucin in vitro markiert waren.

2.3.2. Gelelektrophoretische Analyse der den mitochondrialen monomeren und polymeren Ribosomen anhängenden Translationsprodukte.

In Abbildung 20 A ist ein Radioaktivitätsprofil eines Dichtegradienten nach Zentrifugation von m-Ribosomen dargestellt, deren naszierende Peptidketten in vivo plus Cycloheximid markiert wurden.
Zur gelelektrophoretischen Analyse der den Polysomen und Monosomen anhängenden Peptide wurden die Polysomenfraktionen 1 bis 9 sowie 10 bis 13, die Disomenfraktion 15 und die Monosomenfraktion 19 mit AMT-Puffer verdünnt und die ribosomalen Partikel abzentrifugiert. Nach Lösen der Partikel in 0,1 M Tris-HCl, 1 % SDS pH = 8 wurden die Proben zwei Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch analysiert.
Abbildung 20 B zeigt das Ergebnis der Analyse des Gesamtproduktes (Fraktion 1 bis 20). Das den Polysomen anhängende Produkt (Abb. 21 A und 21 B) zeigt eine breite Verteilung ohne definierte Banden. Dieselben Verhältnisse findet man im Falle der Disomen (Abb. 21 C). In diesem Zusammenhang erscheint es wichtig zu bemerken, daß die Analyse der Ribosomen, die sich nach Gradientenzentrifugation im Pellet befinden, ein den Polysomen entsprechendes Profil ergibt (nicht dargestellt). Die mit Monosomen assoziierten Peptidketten bilden im Gegensatz dazu im wesentlichen zwei scharfe Banden mit den scheinbaren Molekulargewichten 27000 und 5000-10000 (Abb. 22). Eine Kleine Bande findet sich bei einem scheinbaren Molekulargewicht von 18000. Die Addition der Kurven in den Abbildungen 21 A, B, C und Abbildung 22 ergibt eine Verteilung wie sie für die Analyse des Gesamtproduktes (Abb. 20 B) gefunden wurde.

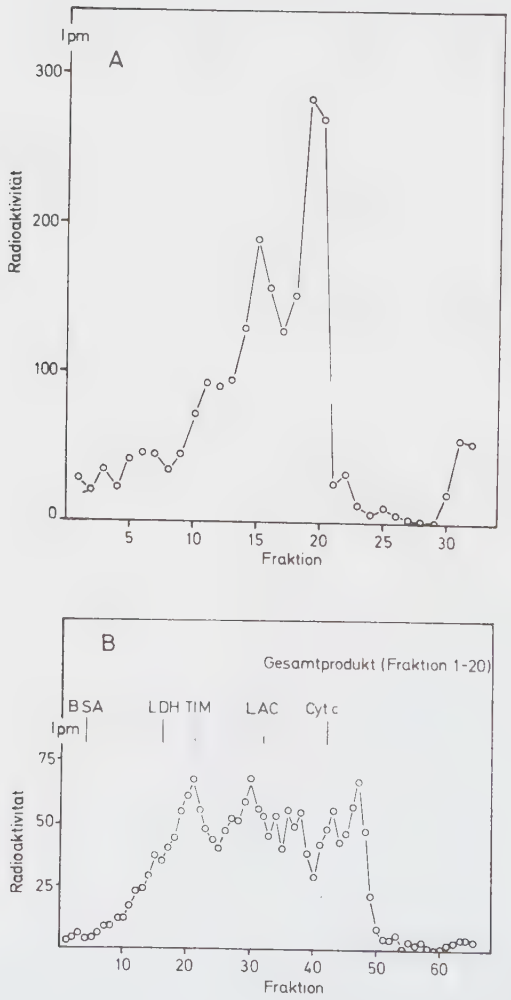


Abb. 20

A: Saccharosedichtegradientenprofil mitochondrialer Ribosomen dargestellt durch die den Ribosomen anhängenden radioaktiv markierten Peptidketten. Zur Markierung der Peptidketten wurden ganze Zellen in Gegenwart von Cycloheximid mit radioaktivem Leucin inkubiert.

B: Gelelektrophoretische Analyse des den m-Ribosomen anhängenden Produktes (Fraktion 1 bis 20).

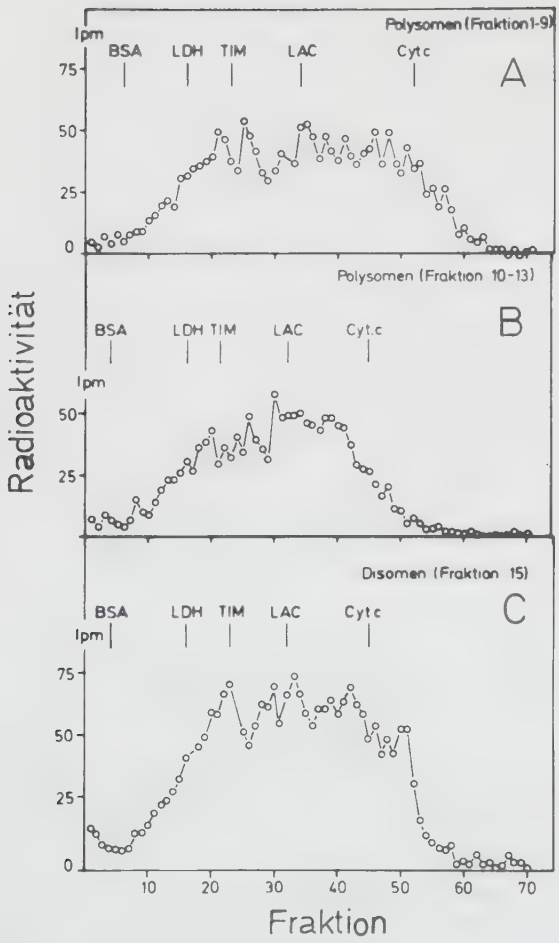


Abb. 21

Gelelektrophoretische Analyse der den höheren Polysomen (Fraktion 1-9 sowie Fraktion 10-13) und den Disomen (Fraktion 15) anhängenden Produkte (vergl. dazu Abb. 20 A).

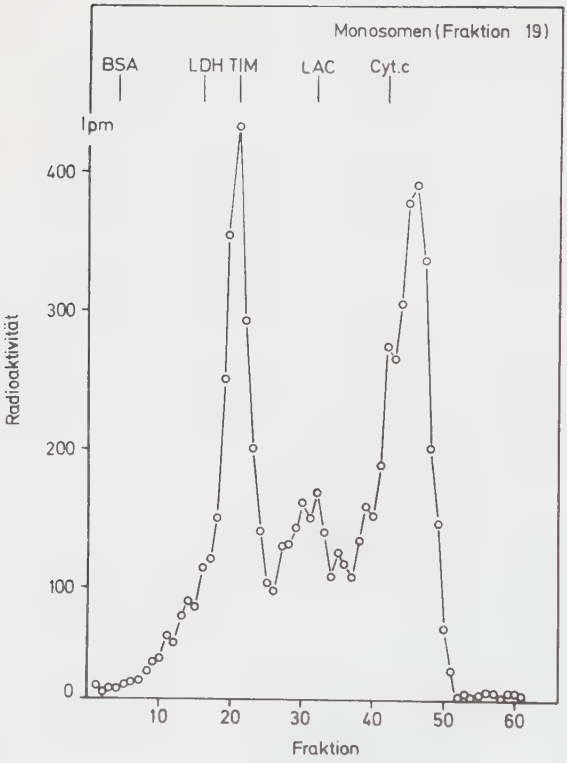


Abb. 22

Gelelektrophoretische Analyse des den Monosomen anhängenden Produktes (Fraktion 19 in Abb. 20 A).

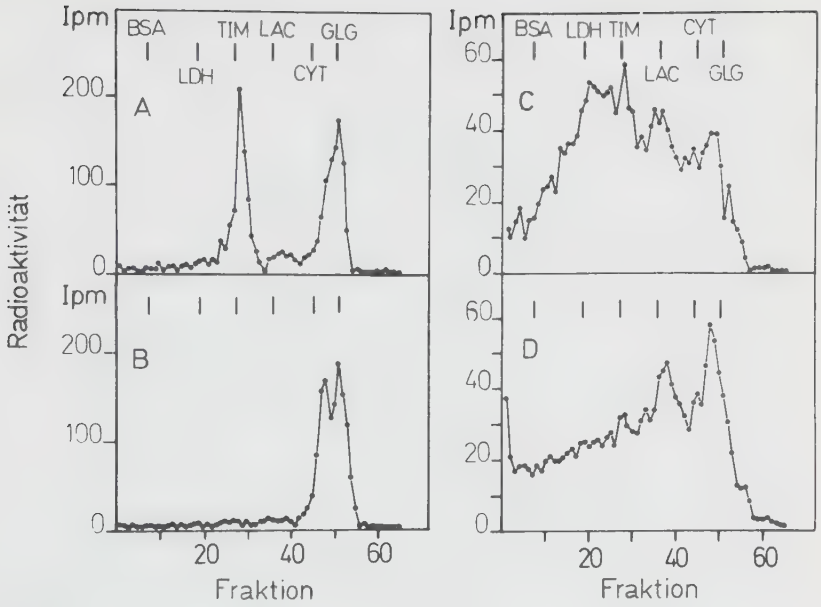


Abb. 23

Gelelektrophoretische Analyse der mit mitochondrialen polymeren und monomeren Ribosomen assoziierten Peptidketten vor und nach Behandlung mit Ribonuclease (0,5 mg/ml):
A, B: Monosomen, C, D: Polysomen,
A, C: Kontrollen, B, D: mit RNase behandelt.

Abbildung 23 stellt die gelelektrophoretische Analyse der mit mitochondrialen Polysomen und Monosomen assoziierten Peptidketten vor und nach RNase-Behandlung dar. Werden die Polysomen vor der Analyse mit RNase behandelt, so verschiebt sich die Radioaktivität teilweise zu kleineren Molekular-

gewichten (Abb. 23 C und D). Im Falle der Monosomen verschwinden die Banden mit den Molekulargewichten 27000 und 18000. Die Radioaktivität ist dann in einer Doppelbande zu finden, die einem Molekulargewicht von 5000 - 10000 entspricht (Abb. 23 A und B). Dies läßt vermuten, daß die Banden mit den scheinbaren Molekulargewichten 27000 und 18000 Peptidyl-Transfer-RNS darstellen. Die Labilität bei alkalischem pH würde diese Folgerung unterstützen. Phenylalanyl-Transfer-RNS aus Hefe wandert auf den hier verwendeten Gelen wie ein Molekül mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 15000. Offensichtlich bewirkt die zweistündige Vorinkubation der Ribosomen in detergenzhaltigem Puffer nicht die Hydrolyse aller Esterbindungen zwischen Peptiden und Transfer-RNS, während Ribonuclease-Behandlung vollständige Trennung der Transfer-RNS vom Peptid bewirkt.

Dieses Ergebnis ist neben der Puromycinablösbarkeit der Peptidketten ein weiterer Hinweis dafür, daß sich die Translationsprodukte der Mitochondrien, sowohl an den Polysomen als auch an den Monosomen in Form von Peptidyl-Transfer-RNS befinden. Einen zusätzlichen Hinweis für die Richtigkeit dieser Annnahme lieferten die Experimente, die in Abbildung 24 dargestellt sind.

Behandelt man die Monoribosomen mitsamt anhängendem Produkt zwei Stunden bei 37°C in 0,1 M Tris-HCl, 1 % SDS pH = 8, so erhält man drei Radioaktivitätsbanden. Die Bande mit dem scheinbar kleinsten Molekulargewicht ist in diesem Fall am stärksten markiert (Abb. 24 A). Nach Vorbehandlung der Monosomen in schwach saurem Medium (pH = 6) dagegen findet sich der größte Teil der Radioaktivität in der Bande, die dem Molekulargewicht 27000 entspricht (Abb. 24 B), nach Vorbehandlung in alkalischem Medium (pH = 11) ausschließlich in der Bande mit dem scheinbar kleinsten Molekulargewicht (Abb. 24 C).

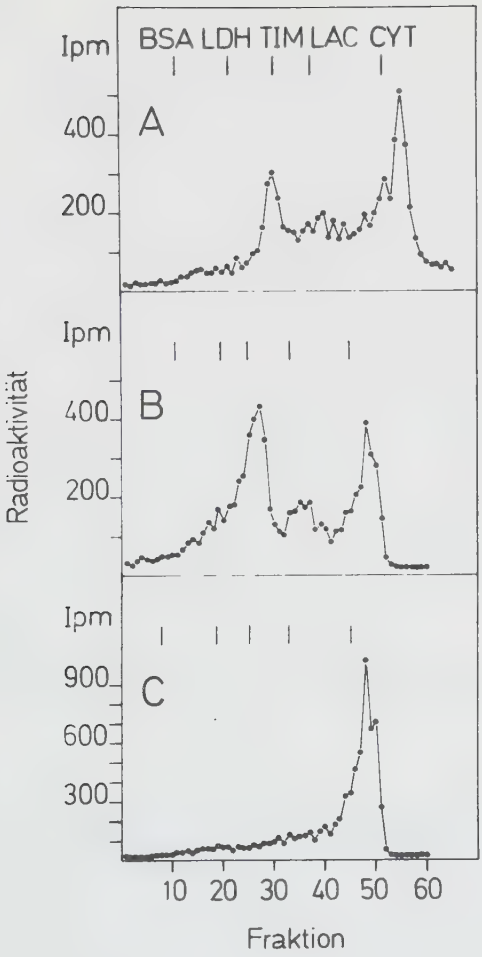


Abb. 24

Gelelektrophoretische Analyse des den mitochondrialen Monosomen anhängenden Produktes nach zweistündiger Inkubation in detergenzhaltigen Puffern bei verschiedenen pH-Werten:
A : 1 % SDS, 0,1 M Tris-HCl pH = 8,
B : 1 % SDS, 0,1 M Phosphatpuffer pH = 6,
C : 1 % SDS, 0,1 M Boratpuffer pH = 11.

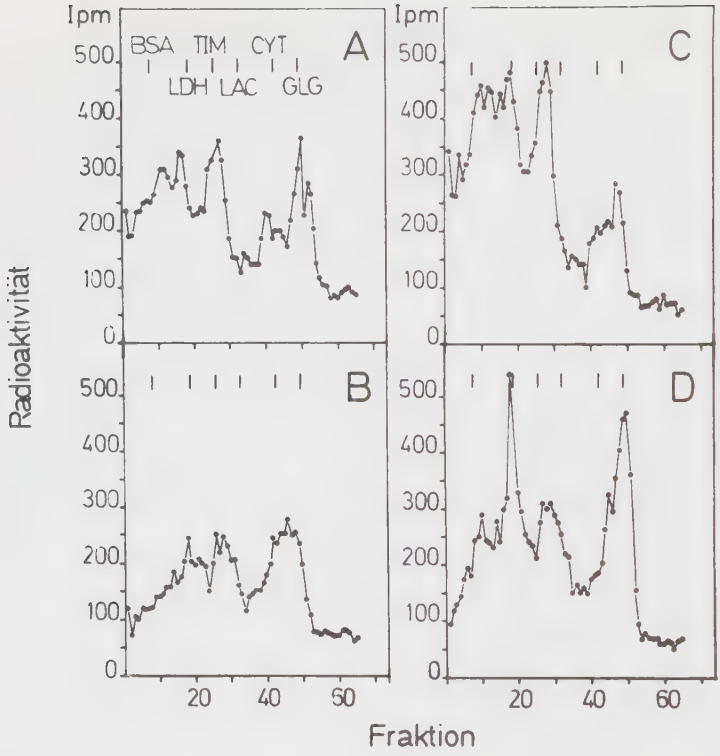


Abb. 25

Gelelektrophoretische Analyse der mit cytosolischen polymeren und monomeren Ribosomen assoziierten Peptidketten vor und nach Behandlung mit Ribonuclease (0,5 mg/ml):
A, B: Monosomen,
C, D: Polysomen,
A, C: Kontrollen,
B, D: mit RNase behandelt.

2.3.3. Gelelektrophoretische Analyse der den cytosolischen polymeren und monomeren Ribosomen anhängenden naszierenden Peptidketten.

Wie im Fall der m-Ribosomen, wurden nach Kurzzeitmarkierung der naszierenden Peptidketten an den c-Ribosomen (siehe 2.1.1.) die Polysomen und Monosomen getrennt aus dem Dichtegradienten isoliert. Nach Vorinkubation unter den gleichen Bedingungen wie bei m-Ribosomen, wurden gelelektrophoretische Trennungen durchgeführt. Zwischen den an Polysomen und Monosomen befindlichen naszierenden Peptidketten ist nach dieser Methode sowohl für Proben, die mit Ribonuclease behandelt wurden, als auch für jene, die ohne RNase inkubiert wurden, kein Unterschied zu beobachten. Nach RNase-Behandlung verschiebt sich die Radioaktivität in beiden Fällen teilweise in Richtung zu kleineren Molekulargewichten (Abb. 25).

2.4. Charakterisierung der mitochondrialen Translationsprodukte nach Abgabe in die Mitochondrienmembran.

In den Experimenten dieses Kapitels wird das Markierungsmuster der Mitochondrienmembranen untersucht, in denen die vom mitochondrialen Proteinsynthesesystem gebildeten Peptide spezifisch markiert sind. Das heißt, es wird versucht, die von den m-Ribosomen gebildeten Peptidketten nach der Abgabe in die Membran zu verfolgen. Die Kinetik des Einbaus von radioaktiven Aminosäuren in Membranmaterial unter verschiedenen Bedingungen (*in vitro* und *in vivo* plus Cycloheximid) wird studiert. Dazu erfolgt nach verschieden langen Einbauperioden die Isolierung der Membranen und deren gelelektrophoretische Analyse.

Auf der Basis dieser Experimente kann vermutet werden, daß die von den m-Ribosomen an die Membran abgegebenen Peptidketten eine sekundäre Modifizierung erfahren.

2.4.1. Einbau von radioaktiven Aminosäuren in mitochondriale Membranen in vivo in Anwesenheit von Cycloheximid.

Nach 2,5 Minuten Vorinkubation ganzer Zellen mit Cycloheximid wurde radioaktives Leucin verschieden lang eingebaut. Nach 1,5, 7, 30 und 60 Minuten wurden der Hyphensuspension jeweils gleiche Volumina entnommen und daraus sowohl mitochondriale Ribosomen als auch mitochondriale Membranen isoliert.

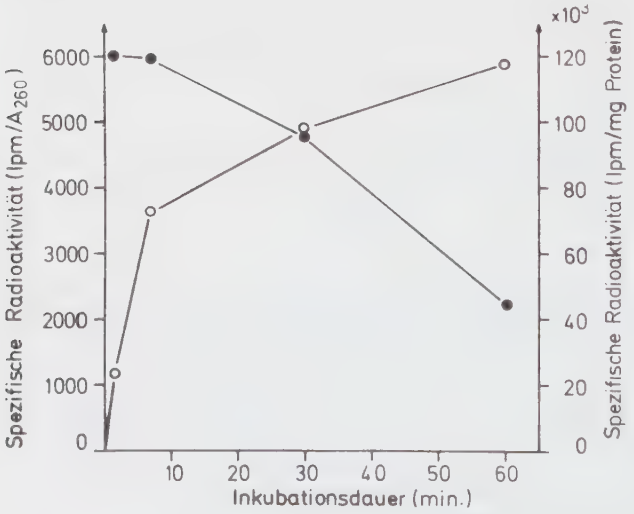


Abb. 26

Kinetik des Einbaus von radioaktivem Leucin (in vivo plus Cycloheximid) in mitochondriale Membranen und in naszierende Peptidketten an den m-Ribosomen:

Mitochondriale Membranen: -o— o- (lpm/mg Protein)
Mitochondriale Ribosomen: -● — ●- (lpm/A_{260})

In Abbildung 26 ist zum einen diejenige Radioaktivität dargestellt, die nach den jeweiligen Zeiten mit den Ribosomen assoziiert ist. Zum anderen zeigt die Abbildung die in die Membran eingebaute Radioaktivität. Folgendes läßt sich daraus klar ersehen: Mit zunehmender Inkubationsdauer verringert sich die mit den Ribosomen assoziierte Radioaktivität. Die spezifische Markierung der Membranen hingegen steigt an. Die gelelektrophoretische Analyse dieser Membranen ergab folgendes Ergebnis (Abb. 27): Nach kurzzeitiger Markierung (1,5 min) findet man in den Membranen im wesentlichen nur Radioaktivität im Molekulargewichtsbereich von 5000 - 10000, mit zunehmender Inkubationsdauer mehr und mehr in den Banden, die höheren Molekulargewichten entsprechen. Das beschriebene Experiment führt im Zusammenhang mit den Ergebnissen, die in 2.3. dargestellt sind, zu folgenden Feststellungen:

1. Bei der Isolierung mitochondrialer Membranen gelangen die an den m-Ribosomen befindlichen naszierenden Peptidketten zum größten Teil in die Membranfraktion (vergl. dazu 2.1.). Um zu demonstrieren, daß diese Kontamination die Ergebnisse nicht verfälschen kann, sei folgende Überlegung angestellt. Messungen des RNS-Gehaltes von isolierten Mitochondrien ergaben einen Durchschnittswert von 40 µg Ribosomen-RNS pro mg mitochondrialen Membranproteins. Daraus und aus den Werten der Abbildung 26 läßt sich errechnen, daß der Anteil der an den Ribosomen befindlichen Radioaktivität an der gesamten in die Mitochondrien eingebauten Radioaktivität nach den Inkubationsperioden von 1,5, 7, 30 und 60 Minuten jeweils 18, 7, 5 und 2 % beträgt. Demzufolge sind durch die ribosomale Kontamination der Membranen keine Verfälschungen der elektrophoretischen Daten zu erwarten.

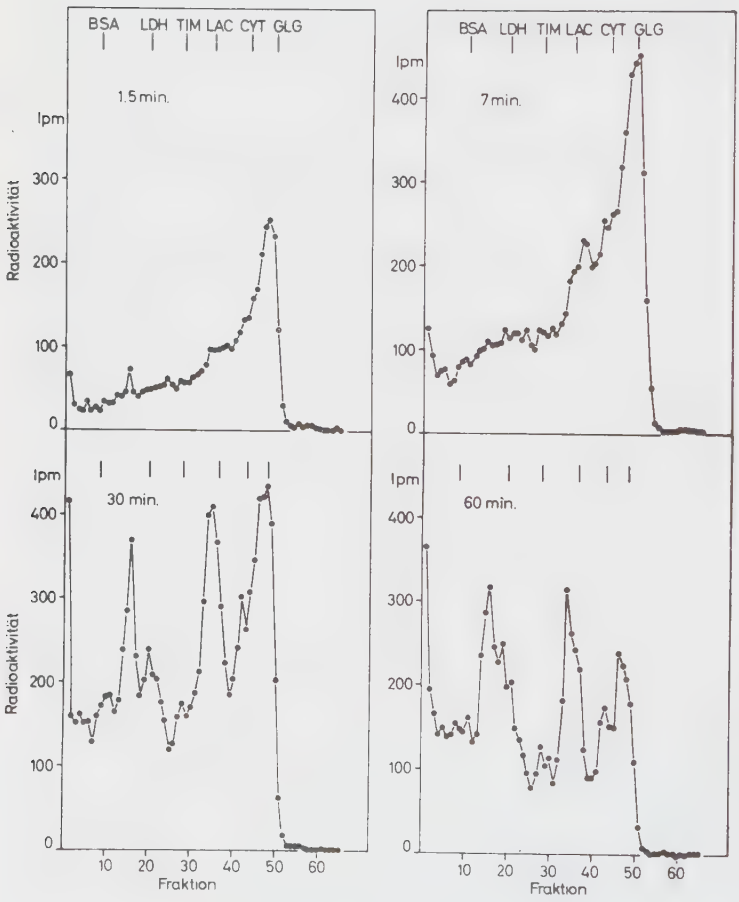


Abb. 27

Gelelektrophoretische Analyse mitochondrialer Membranen aus Zellen, die nach Vorinkubation mit Cycloheximid für 1,5, 7, 30 und 60 min mit ^{3}H-Leucin inkubiert wurden.

2. An den mitochondrialen Monoribosomen befinden sich nach Kurzzeitmarkierung (1,5 min) Peptide, die verglichen mit denen, die unter gleichen Markierungsbedingungen in der Membran auftreten, etwa das gleiche scheinbare Molekulargewicht haben. An den Polyribosomen dagegen befinden sich Peptide, die scheinbar größere Molekulargewichte aufweisen, größer als jene, die zu diesem Zeitpunkt in der Membran auftreten. Somit liegt nahe anzunehmen, daß es sich bei den scheinbar größeren Molekülen an den Polyribosomen um Aggregationsprodukte handelt.
Das beschriebene Experiment deutet darauf hin, daß die von den Ribosomen an die Membran abgegebenen Peptidketten in der Membran zu scheinbar größeren Molekülen verändert werden.
Um eine solche Umwandlung zu erfassen, wurde folgendes Experiment durchgeführt:
Nach Zugabe von Cycloheximid zu ganzen Zellen und 1,5-minütiger Inkubation mit radioaktivem Leucin, wurde zu dem Versuchsansatz unmarkiertes Leucin zugegeben ("Chase"). Die Zugabe der unmarkierten Aminosäure soll bewirken, daß keine Radioaktivität mehr in Protein eingebaut wird. Somit kann die Veränderung des nach 1,5 Minuten in der Membran vorhandenen, radioaktiv markierten Produktes verfolgt werden.
Es wurde zunächst zu verschiedenen Zeiten nach Zugabe der unmarkierten Aminosäure die spezifische Radioaktivität der Mitochondrienmembran bestimmt (Abb. 28). Sie bleibt in dem hier verwendeten Meßbereich konstant. Das bedeutet, daß nach Zugabe der unmarkierten Aminosäure tatsächlich keine Radioaktivität mehr in Membranprotein eingebaut wurde.

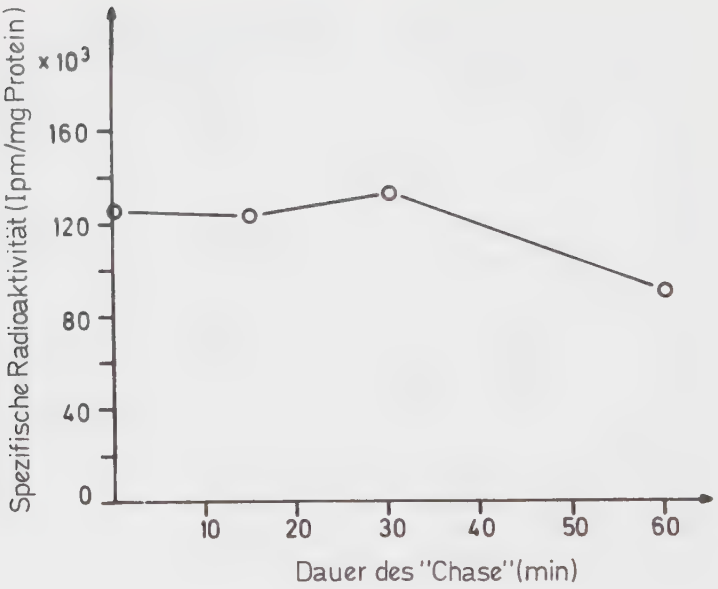


Abb. 28

Spezifische Radioaktivität von Mitochondrienmembranen aus Zellen, die in Gegenwart von Cycloheximid einer Puls-Chase-Markierung ausgesetzt wurden:
Der Puls von ^{3}H-Leucin dauerte 1,5 min und war gefolgt von einem "Chase" von unmarkiertem Leucin (2 mM) für die der Abbildung zu entnehmenden Zeiten.

Einen weiteren Beweis dafür, daß nach Gabe des "Chase" keine radioaktiven Aminosäuren mehr in die naszierenden Peptide an den m-Ribosomen und damit in die Membranproteine eingebaut werden, liefert die folgende Beobachtung (Abb. 29):

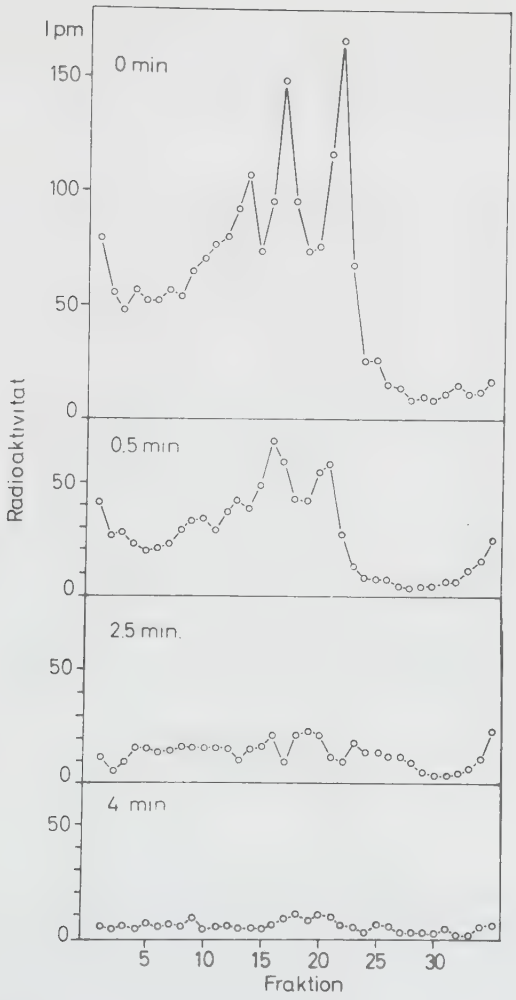


Abb. 29

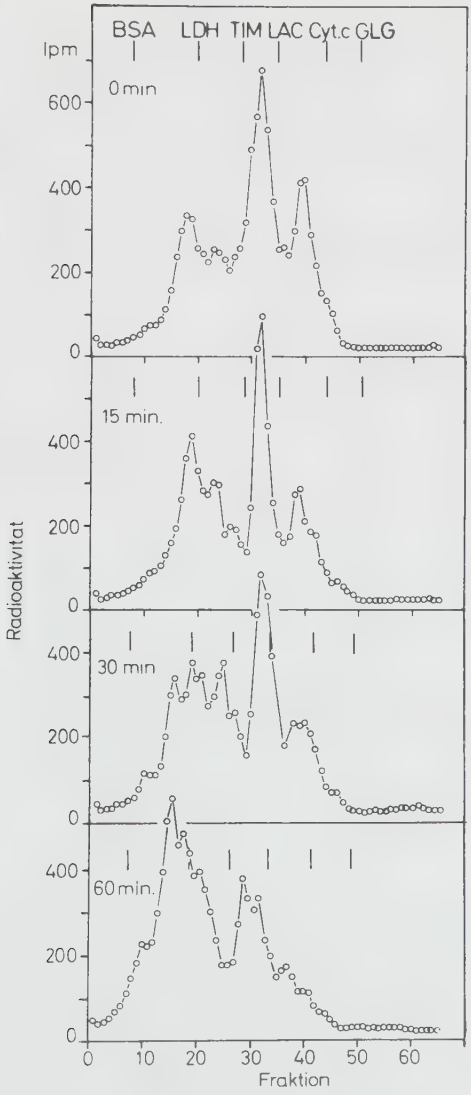
Dichtegradientenzentrifugation von m-Ribosomen nach Puls-Chase-Markierung der naszierenden Peptidketten mit Leucin: Ganzen Zellen wurde zuerst für 2,5 min Cycloheximid, dann ^{3}H-Leucin zugesetzt. Nach 1,5 min wurde unmarkiertes Leucin (2 mM) zugegeben und nach verschiedenen Zeiten (0, 0,5, 2,5 und 4 min) aus gleichen Anteilen des Versuchsansatzes - nach Abkühlen auf 0°C - m-Ribosomen isoliert.

30 Sekunden nach Zugabe der unmarkierten Aminosäure ist die Radioaktivität in den naszierenden Peptidketten an den m-Ribosomen um ca. 80% vermindert. Nach 2,5 Minuten ist praktisch keine Radioaktivität mehr mit den Ribosomen assoziiert.

Diese Befunde sind Voraussetzung für das Studium der sekundären Veränderung der mitochondrialen Translationsprodukte in der Membran. Die gelelektrophoretische Analyse der Membranen, die nach verschiedenen Chaseperioden aus den Hyphen isoliert wurden, ist in Abbildung 30 dargestellt. Nach 1,5 Minuten Inkubation mit radioaktivem Leucin, d.h. ohne "Chase", findet sich der Hauptteil der Radioaktivität in Banden mit den scheinbaren Molekulargewichten von ca. 11000 und 18000. Bei der weiteren Inkubation in Gegenwart der unmarkierten Aminosäure tritt die Radioaktivität mehr und mehr in den Banden mit scheinbar größeren Molekulargewichten auf. Die Bande mit dem scheinbaren Molekulargewicht von ca. 11000 verschwindet zugunsten der Banden mit den größeren Molekulargewichten. Der Anteil der Bande mit dem scheinbaren Molekulargewicht von 18000 an der gesamten Radioaktivität im Gel nimmt nur gering ab.

Abb. 30

Gelelektrophoretische Analyse mitochondrialer Membranen nach Puls-Chase-Markierung mit Leucin in vivo plus Cycloheximid:
Ganze Zellen wurden für 2,5 min mit Cycloheximid vorinkubiert, dann wurde ^{3}H-Leucin zugesetzt. Nach 1,5 min wurde unmarkiertes Leucin (2 mM) zugegeben und nach verschiedenen Zeiten (0, 15, 30 und 60 min) mitochondriale Membranen isoliert.


BSA
LDH
TIM
LAC
Cyt.c
GLG
lpm
0 min
15 min.
30 min
60 min.
600
400
200
0
Radioaktivitat
0
10
20
30
40
50
60
Fraktion

2.4.2. Einbau von radioaktiven Aminosäuren in mitochondriale Membranen *in vitro*.

Bei dem Einbau von radioaktiven Aminosäuren in isolierte Mitochondrien sind die Komponenten des cytosolischen Proteinsyntheseapparates vom mitochondrialen Proteinsyntheseapparat abgetrennt. Diese Versuchsanordnung unterscheidet sich von der des vorausgegangenen Abschnitts offensichtlich darin, daß sich im Cycloheximid-blockierten *in vivo* - System noch cytosolische Komponenten befinden, die mit den mitochondrialen Syntheseprodukten reagieren können.
Zunächst wurde die spezifische Radioaktivität der Mitochondrien nach Fällung mit Trichloressigsäure ermittelt. Etwa 10 Minuten lang erfolgt der Einbau mit konstanter Geschwindigkeit, nach ca. 15 Minuten stoppt der Einbau. Noch längere Einbauzeiten führen zu einer Abnahme der eingebauten Radioaktivität (Abb. 31).
Zu jedem Punkt dieser Kinetik wurden die Membranen isoliert und gelelektrophoretisch analysiert (Abb. 32). In allen Proben treten im wesentlichen Banden auf, die den Molekulargewichten ca. 11000 und 18000 entsprechen. Banden mit scheinbar größeren Molekulargewichten treten nach Langzeitinkubation im Vergleich zur Situation *in vivo* nur in sehr geringem Maße auf. Offensichtlich findet in dem *in vitro* - System nur eine geringe Umwandlung der Translationsprodukte zu größeren scheinbaren Molekulargewichten hin statt.
Der Grund für dieses Verhalten ist nicht bekannt.

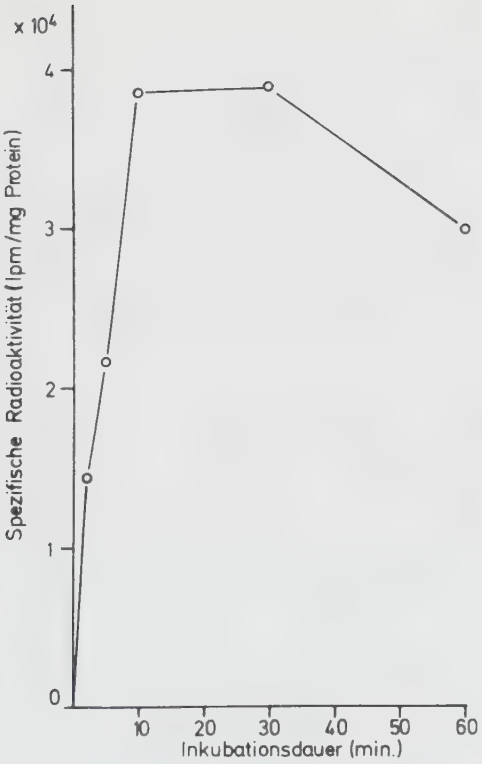


Abb. 31

Kinetik des Einbaus von ^{3}H-Leucin in isolierte Mitochondrien (Versuchsbedingungen siehe 4.6.2.)

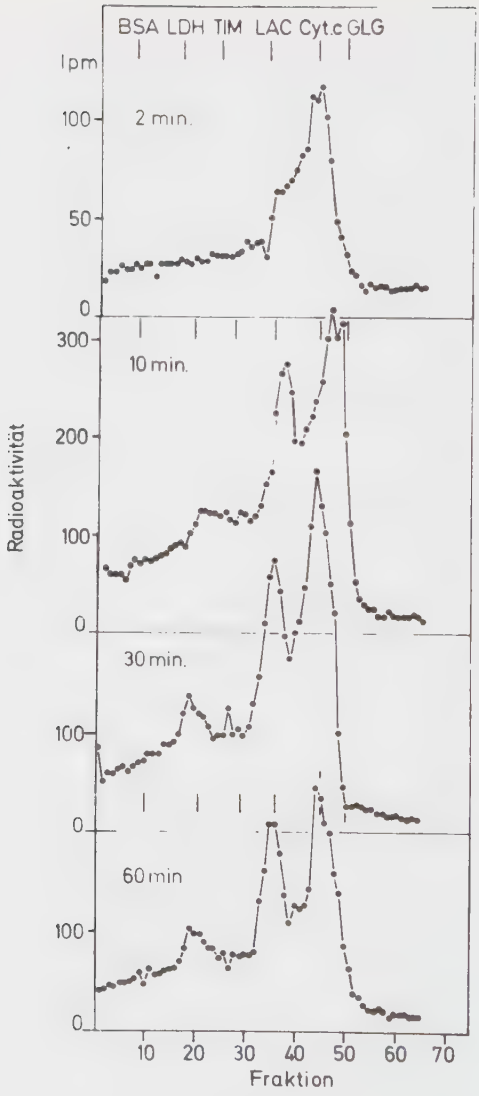


Abb. 32

Gelelektrophoretische Analyse mitochondrialer Membranen nach in vitro Markierung (2, 10, 30 und 60 min) mit ^{3}H-Leucin.

2.5. Experimente zur Lokalisierung von m-Ribosomen

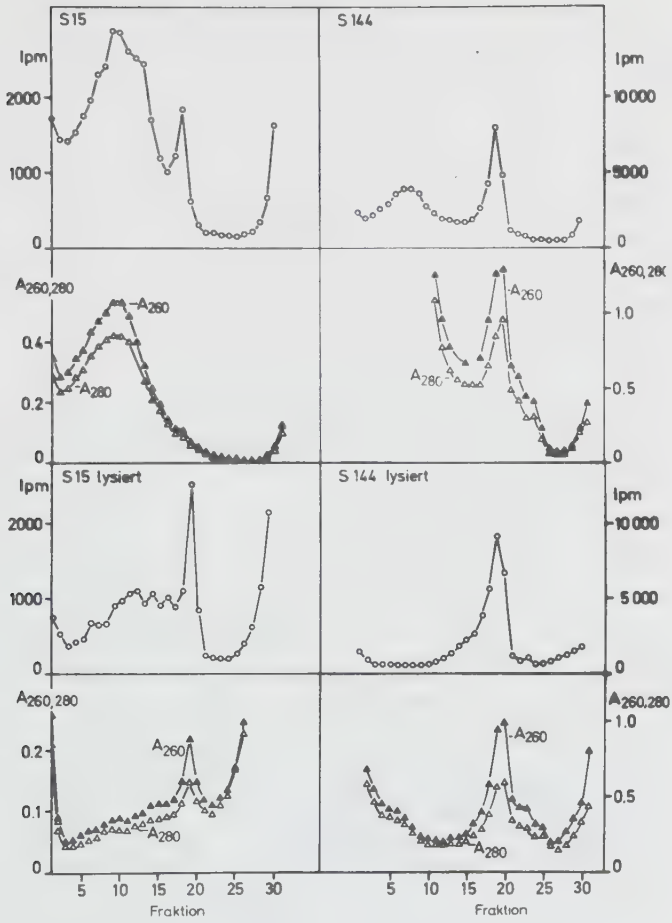
Bei den bis jetzt in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Isolierung von m-Ribosomen werden Detergenzien wie Triton X-100 (23) oder Desoxicholat (24) verwendet, um die Mitochondrienmembran aufzulösen und damit die Ribosomen freizusetzen. Diese Bedingungen erlauben keine Aussagen über die Lokalisation der Ribosomen in den Mitochondrien. Prinzipiell sind dazu drei Möglichkeiten zu diskutieren. Die m-Ribosomen sind ein integraler Bestandteil der mitochondrialen Innenmembran, sie liegen an die mitochondriale Innenmembran gebunden vor, sie bewegen sich frei in der Matrix.
Zur Klärung dieses Problems werden Experimente beschrieben, in denen der Matrixraum eröffnet wird, um den m-Ribosomen, im Falle daß sie nicht an die Membran gebunden sind, die Möglichkeit zu geben, den Matrixraum zu verlassen. Dazu wurden die Mitochondrien isoliert und die den m-Ribosomen anhängenden Peptidketten pulsmarkiert. Sodann wurden zwei Verfahren angewendet, um die Mitochondrien zu öffnen. Im ersten Verfahren wurde eine Suspension von Mitochondrien mit Ultraschall behandelt. Die Suspension wurde dann bei niedrigen g-Werten (20 min, 15000 x g) zentrifugiert, um große Vesikel zu sedimentieren (S 15). Aus dem resultierenden Überstand wurden dann bei 144000 x g (1 Stunde) kleinere Vesikel und m-Ribosomen abzentrifugiert (S 144). Die Sedimente wurden dann jeweils mit Triton X-100 behandelt. Alle Proben wurden auf Saccharosegradienten zentrifugiert. In den Gradientenfraktionen wurde dann die optische Dichte bei 260 und bei 280 nm, sowie die Radioaktivität bestimmt.

Das Ergebnis ist in Abbildung 33 dargestellt. Das Absorptionsprofil des S 15 - Pellets zeigt im unteren Drittel die Anwesenheit von Vesikeln an, die in Folge ihrer größeren

Masse schneller sedimentieren als die Ribosomen. In der für das Monosom zu erwartenden Position (Fraktion 19) findet sich eine sehr kleine Schulter. Im Radioaktivitätsprofil ist das Monosom als deutlicher Gipfel zu erkennen, wenn sich auch der Hauptteil der Radioaktivität in den Membranfraktionen befindet. Dies erklärt sich dadurch, daß die Ribosomen durch die Pulsmarkierung eine höhere spezifische Markierung erfahren haben als die Membranproteine. Offensichtlich befinden sich in dieser Vesikelpräparation freie Ribosomen.
Nach Lyse der S 15 - Fraktion finden sich im unteren Drittel des Gradienten kaum noch Partikel und im Absorptionsprofil erscheint an der Stelle des Monoribosoms ein kleiner Gipfel. Im Radioaktivitätsprofil ist dieser Gipfel deutlich ausgeprägt. Er ist jedoch nicht signifikant höher als im Fall der nicht lysierten Probe. Diese Befunde zeigen, daß im S 15 - Sediment Ribosomen in freiem Zustand vorliegen und daß sich innerhalb der Vesikel dieser Fraktion keine Ribosomen befinden.

Abb. 33

Freisetzung von m-Ribosomen durch Ultraschallbehandlung einer Mitochondriensuspension:
Nach Einbau von radioaktiven Leucin in isolierte Mitochondrien wurden diese zweimal gewaschen und anschließend mit Ultraschall behandelt (siehe 4.2.2.). Danach wurde die Suspension zunächst 20 min bei 15000 x g, der resultierende Überstand dann 1 Stunde bei 144000 x g zentrifugiert. Die Sedimente aus beiden Zentrifugationen (S 15 und S 144) wurden geteilt, wonach je ein Teil davon mit Trition X-100 (Endkonzentration 1%) behandelt wurde. Alle Proben wurden auf konvexen Gradienten zentrifugiert und anschließend in den Gradientenfraktionen sowohl die optische Dichte (A_{260} und A_{280}) als auch die Radioaktivität bestimmt.


S15
S 144
lpm
2000
1000
0
10000
5000
A260,280
A260
A280
0.4
0.2
1.0
0.5
S 15 lysiert
S 144 lysiert
5 000
0.1
5
10
15
20
25
30
Fraktion

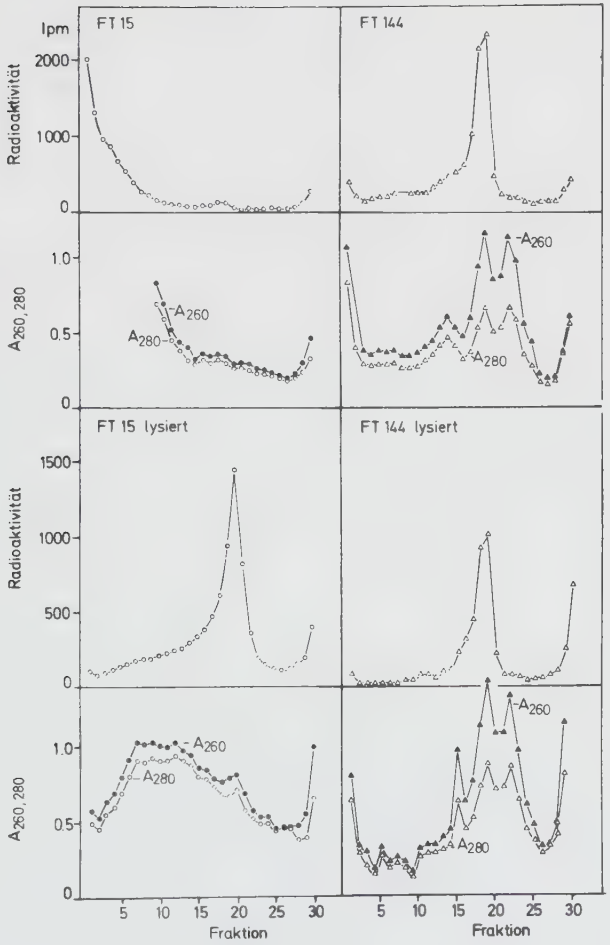
Nach der Zentrifugation des 144000 x g - Sediments erscheint im Absorptionsprofil des Gradienten, in der Position des monomeren Ribosoms, ein ausgeprägter Gipfel. Er übersteigt in seiner Höhe den entsprechenden Gipfel der lysierten S 15 - Probe um einen Faktor von mehr als 5. Auch im Radioaktivitätsprofil ist an der Stelle des Monosoms ein deutlicher Gipfel erkennbar, der wieder etwa um fünfmal höher ist als der entsprechende der S 15 - Probe. Nach Lyse der S 144 - Fraktion sind die Gipfel im Radioaktivitätsprofil sowie im Profil der optischen Dichte etwa gleich hoch.

Aus diesem Experiment läßt sich schließen, daß mehr als 90 % der m-Ribosomen aus Mitochondrien durch Ultraschallbehandlung befreit werden können.

In einem zweiten experimentellen Ansatz wurden die Mitochondrien einer wiederholten Einfrier- und Auftauprozedur unterworfen. Es ist bekannt, daß dieses Verfahren zu einer Öffnung des Matrixraumes und zum Ausfließen der Matrixenzyme führt (25). Nach dieser Behandlung wurde die Mitochondriensuspension dem gleichen Zentrifugationsverfahren unterzogen wie im Fall der Ultraschallbehandlung. Die Analyse durch Gradientenzentrifugation der beiden Sedimente (FT 15 und FT 144) vor und nach Lyse mit Triton X-100 ergibt folgendes Bild: (Abb. 34)

Abb. 34

Freisetzung von m-Ribosomen durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen einer Mitochondriensuspension:
Nach Einbau von radioaktivem Leucin in isolierte Mitochondrien wurden diese zweimal gewaschen und anschließend mehrmals in einem Trockeneis-Aceton-Bad eingefroren und bei Raumtemperatur wieder aufgetaut (siehe 4.2.2.). Die weitere Behandlung dieser Suspension erfolgte wie im Falle der Freisetzung von Ribosomen aus Mitochondrien durch Ultraschallbehandlung (vergl. Legende zu Abb. 33).


FT 15
FT 144
lpm
2000
1000
0
Radioaktivität
1.0
0.5
0
A260,280
A260
A280
FT 15 lysiert
FT 144 lysiert
1500
1000
500
5
10
15
20
25
30
Fraktion

Nach Zentrifugation des 15000 x g - Sediments kann im Gradienten weder im Radioaktivitätsprofil noch im Absorptionsprofil die Anwesenheit von Monoribosomen beobachtet werden. Die Lyse dieser Fraktion setzt jedoch in großem Ausmaß Ribosomen frei; dies erkennt man am Radioaktivitätsprofil. In Folge sehr hoher Proteinkonzentrationen sind die Vesikel nur unvollständig lysiert worden. Bei der Analyse des FT 144 - Pellets finden sich freie Ribosomen, sowohl im Radioaktivitätsprofil als auch im Absorptionsprofil. Die monomeren Ribosomen sind dabei etwa zur Hälfte in Untereinheiten zerfallen. Die Menge der durch die Behandlung freigesetzten Ribosomen ist vergleichbar mit derjenigen in den Vesikeln der FT 15 - Fraktion. Aus der FT 144 - Fraktion lassen sich durch Lysieren keine weiteren Ribosomen freisetzen.

Diese Ergebnisse demonstrieren, daß beim Öffnen der Mitochondrienmembran durch Einfrieren und Auftauen etwa die Hälfte der m-Ribosomen den Matrixraum verlassen. Dieser Anteil erscheint hoch, da nicht erwartet werden kann, daß so relativ große Partikel wie die Ribosomen bei kurzzeitigem Öffnen der Mitochondrienmembran den Matrixraum verlassen.
Im Zusammenhang mit diesen Experimenten sei noch erwähnt, daß durch Ultraschallbehandlung einer Präparation von rauhen endoplasmatischem Retikulum der Rattenleberzelle unter gleichen experimentellen Bedingungen weniger als 10 % der membrangebundenen Ribosomen freigesetzt werden.

Auf Grund dieser Ergebnisse kann man ausschließen, daß die m-Ribosomen kein integraler Bestandteil der Mitochondrieninnenmembran sind. Es ist anzunehmen,daß die m-Ribosomen nicht, oder zumindest nicht dauernd, fest an die mitochondriale Innenmembran gebunden sind.

3. DISKUSSION

Eine grobe Kalkulation der an m-Ribosomen, dem Ort ihrer Synthese, vorliegenden Translationsprodukte ergab einen Wert von 0,01 - 0,05 µg/mg Zellprotein. Diese Überlegung läßt eine präparative Gewinnung der Translationsprodukte an den Ribosomen mit derzeit verfügbaren Methoden aussichtslos erscheinen. Deshalb wurde geplant, die naszierenden Peptidketten mit radioaktiven Isotopen zu markieren, um sie dann anhand ihrer Radioaktivität analysieren zu können. In diesem Sinne waren experimentelle Bedingungen zu schaffen, unter denen spezifisch die naszierenden Peptidketten radioaktiv markiert werden, nicht hingegen die Strukturproteine der Ribosomen. Dazu wurden zwei Verfahren eingesetzt: die Pulsmarkierung von Neurospora-Zellen in Gegenwart von Cycloheximid und von isolierten Mitochondrien (14, 26) mit radioaktiven Aminosäuren.

3.1. Selektive Markierung der Translationsprodukte

Folgende Beobachtungen beweisen, daß unter diesen Bedingungen tatsächlich die Spezifität der Markierung der Translationsprodukte gewährleistet ist.
Die Radioaktivität kann von den Ribosomen durch Puromycinbehandlung der Mitochondrien vollständig entfernt werden, nach Desintegration der Ribosomen kann die Radioaktivität in Peptidyl-Transfer-RNS wiedergefunden werden. Damit werden zugleich Befunde bestätigt, die nachweisen, daß die Strukturproteine der mitochondrialen Ribosomen an den cytosolischen Ribosomen gebildet werden (26,27,28).

Die Translationsprodukte zeichnen sich durch besondere Eigenschaften aus, in denen sie sich von denjenigen an den cytosolischen Ribosomen wesentlich unterscheiden. Die bemerkenswerteste Eigenschaft ist ihre extreme Neigung,

Aggregate zu bilden. Sowohl als freie Peptide als auch in Form von Peptidyl-Transfer-RNS und Peptidyl-Puromycin bilden sie in wässrigen Lösungen Aggregate. Sie können nur in Anwesenheit von Detergenzien, wie Natriumdodecylsulfat, in Lösung gehalten werden. Im Gegensatz dazu erscheinen die naszierenden Peptidketten der cytosolischen Ribosomen, oder zumindest der größte Teil davon, als wasserlösliche Verbindungen.

3.2. Die Natur der polymeren Ribosomen

Auch die mitochondrialen Ribosomen sind, sofern sie ohne weiteres isoliert werden, durch eine starke Aggregationsneigung gekennzeichnet, während im Fall der cytosolischen Ribosomen die Bildung von Aggregaten unter den hier verwendeten Bedingungen vernachlässigbar ist. Mitochondriale Ribosomen, die keine naszierenden Peptidketten tragen, zeichnen sich durch drastisch verringerte Aggregationsneigung aus. Dies geht aus jenen Experimenten hervor, in denen nach Puromycinbehandlung der Mitochondrien die Ribosomen im Dichtegradienten zu einem viel geringeren Prozentsatz am Boden und adsorbiert an der Wand des Zentrifugenbechers vorliegen. Des weiteren läßt sich aus der höheren spezifischen Radioaktivität der Ribosomen in den Aggregaten verglichen mit der der gesamten Ribosomen darauf schließen, daß die mitochondrialen Ribosomen insbesondere dann aggregieren, wenn sie naszierende Peptidketten tragen. Die Aggregationsneigung der mitochondrialen Ribosomen scheint demnach wenigstens zu einem großen Teil auf die anhängenden Peptidketten zurückzuführen zu sein. Diese Besonderheit der mitochondrialen Ribosomen lenkt auf die Frage hin, ob die polymeren Ribosomen, die in den Dichtegradienten auftreten, wirklich messenger-RNS-Ribosomenkomplexe darstellen, oder lediglich Aggregate monomerer Ribosomen sind.

Folgende Versuchsergebnisse müssen zur Beantwortung dieser Frage diskutiert werden:

1. Im Vergleich zu den monomeren Ribosomen weisen die polymeren Ribosomen eine um ein Vielfaches höhere spezifische Radioaktivität auf. Wenn sie tatsächlich funktionelle Komplexe von Ribosomen und messenger-RNS repräsentieren, könnte das bedeuten, daß ein großer Teil der Ribosomen unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen nicht an der Produktion von Peptiden teilnimmt. Nach dem vorher gesagten läßt sich jedoch vermuten, daß es sich bei den polymeren Ribosomen um Aggregate peptidtragender monomerer Ribosomen handelt.

2. Cytosolische polymere Ribosomen können durch Behandlung mit niedrigen RNase-Konzentrationen in monomere Ribosomen umgewandelt werden. Die mitochondrialen polymeren Ribosomen erweisen sich dagegen als resistent gegenüber diesem Enzym. Da selbst 10 - 100 fach höhere Konzentrationen an RNase die polymeren Ribosomen nicht zerlegen können, erscheint eine spezifische Stabilität der mitochondrialen messenger-RNS gegen RNase als unwahrscheinlich. Vielmehr weisen diese Beobachtungen den mitochondrialen polymeren Ribosomen die Natur von Aggregationsprodukten von monomeren Ribosomen zu. Ein ganz ähnliches Verhalten ist für Ribosomen aus HeLa Zellen beschrieben worden (29,30). Auch aus diesen Befunden wurde gefolgert, daß die Polymeren Aggregationsprodukte von Monomeren mit anhängenden Peptidketten darstellen.

3. Werden isolierte mitochondriale Ribosomen mit Puromycin behandelt, so beobachtet man eine Umwandlung von Polysomen in Monosomen. Nach oben gesagten liegt folgende Interpretation nahe: Polymere Ribosomen werden über die anhängenden naszierenden Peptidketten zusammengehalten. Weiterhin kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß der messenger-RNS-Ribosomenkomplex zerfällt, wenn Peptidyl-Transfer-RNS vom Ribosom entfernt wird.

Trotz vorliegender Argumente sind zu einer definitiven Antwort weitere Experimente nötig. Insbesondere muß sich dabei die Aufmerksamkeit auf die Eigenschaften der messenger-RNS richten. Bis jetzt befindet sich in der Literatur kein Bericht über deren Isolierung. Die Existenz mitochondrialer funktioneller Polysomen-messenger-RNS-Komplexe in der intakten Zelle ist nicht bewiesen. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Hefemitochondrien wurden allerdings Strukturen entdeckt, die solche Komplexe darstellen könnten (31). Es ist somit möglich, daß sie zwar existieren, aber bei der Isolierung der Ribosomen zerstört werden.

Eine Möglichkeit, diesem Problem näher zu kommen, liegt in der Analyse der naszierenden Peptidketten, die sich an polymeren und monomeren Ribosomen befinden. Zum Vergleich wurden die naszierenden Peptidketten an den cytosolischen Ribosomen untersucht, bei denen die Beziehung zwischen monomeren und polymeren Ribosomen bekannt ist. Die Verteilung der scheinbaren Molekulargewichte auf SDS-Gelen ist in diesem Fall weitgehend übereinstimmend. Dies ist aus der Beobachtung, daß monomere Ribosomen aus polymeren Ribosomen durch Einwirkung von Ribonuclease entstehen können, durchaus verständlich. Damit steht die Annahme in Einklang, daß die monomeren cytosolischen Ribosomen, wie sie im Dichtegradienten gefunden werden, aus Polysomen durch Zerstörung bei der Isolierung entstehen.

3.3. Die Translationsprodukte an den m-Ribosomen

Im Fall der mitochondrialen Ribosomen stellt sich ein eindeutiger Unterschied in den Eigenschaften der den monomeren und polymeren Ribosomen anhängenden Peptidketten dar. Das Produkt an den Polysomen zeigt nach gelelektrophoretischer Analyse eine breite Verteilung in den Molekulargewichten,

das den Monosomen anhängende scheint sehr einheitlich zu sein. Als Peptidyl-Transfer-RNS stellt es sich als ein Radioaktivitätsgipfel mit dem scheinbaren Molekulargewicht von 27000 dar. Nach RNase-Behandlung tritt eine Doppelbande im scheinbaren Molekulargewichtsbereich von etwa 5000 - 10000 auf. Um eine Erklärung für diese Beobachtung zu finden, muß man sich mit folgenden Alternativen auseinandersetzen:

1. Die aus den Dichtegradienten isolierten monomeren Ribosomen tragen fertigsynthetisierte Peptidketten in der Form von Peptidyl-Transfer-RNS. Die Tertiärstruktur dieses Ribosomen-Produkt-Komplexes erlaubt keine Aggregation zu polymeren Formen. Im Gegensatz dazu tragen die polymeren Ribosomen und die Ribosomen im Sediment des Gradienten unfertige Ketten. In der intakten Zelle sind sie als echte Polysomen-messenger-RNS-Komplexe vorhanden und können nicht aggregieren. Dies geschieht als Artefakt während der Isolierung. Tatsächlich erfolgt eine weitere und bevorzugte Aggregation der Polysomen wenn eine Präparation von isolierten Ribosomen bei 32°C gehalten wird.

Diese Hyphothese fordert eine Erklärung für die Annahme heraus, daß ein großer Teil der mitochondrialen Ribosomen fertige Peptidketten trägt. Es ist durchaus eine Situation vorstellbar, in der Peptidketten an den Ribosomen in jedem möglichen Zustand angetroffen werden. Damit müßte man eine statistische Verteilung für die Molekulargewichte bis zu einem bestimmten Grenzwert hin erwarten. Tatsächlich aber entsprechen die experimentellen Bedingungen nicht der idealen Verteilung einer augenblicklichen Unterbrechung des Synthesevorgangs, die einen bestimmten Synthesezustand festlegt. Obwohl nämlich die Einbaureaktion durch rasches Abkühlen der Zellen auf 0°C beendet wird, bedeutet dies nicht, daß die Polypeptidsynthese augenblicklich gestoppt wird. Von bakteriellen Systemen her ist bekannt, daß die Kettenverlängerung bei Temperaturen von unter 6°C fortschreiten kann, während der Initiierungsschritt und vielleicht auch der Terminierungsschritt der Kette blockiert (32). Tatsächlich bauen isolierte Mitochondrien von Neurospora crassa bei Tem-

peraturen zwischen 0°C und 6°C radioaktives Leucin in die naszierenden Peptidketten an ihren Ribosomen ein (33). Im Vergleich zum Einbau bei 32°C war hierbei die Einbaurate in die naszierenden Peptidketten auf ein Drittel erniedrigt. Der Einbau in die Membranproteine hingegen war unter diesen Umständen weitaus stärker inhibiert, nämlich auf weniger als ein Zehntel. Weiterhin wurde ein Einbau in die naszierenden Peptidketten von mitochondrialen Ribosomen beobachtet, wenn radioaktives Leucin bei 0°C dem Kulturmedium zugesetzt wurde. Dieser Einbau ist sehr gering im Vergleich zu dem Einbau bei 25°C. Dafür dürfte aber auch größtenteils die reduzierte Aufnahme von radioaktiven Aminosäuren bei dieser Temperatur (0°C) verantwortlich sein (33).

Die Präparation der Mitochondrien aus Neurospora-Zellen bis zur Lyse zur Isolierung der Ribosomen dauert durchschnittlich eine Stunde. Während dieser Periode wäre somit genügend Zeit für die Elongation bereits initiierter Ketten. Möglicherweise wird durch diesen Prozeß ein großer Teil der Ketten fertiggestellt, nicht aber an die Membran abgegeben. Dieser Mechanismus würde auch den überraschenden Befund erklären, daß bei der Gelchromatographie des Monosomenproduktes praktisch keine kleinen Komponenten auftreten. Sowohl bei der Chromatographie auf Bio-Gel P 30 als auch auf Sephadex G 200 werden die Peptidketten als symetrischer Gipfel mit einem Molekulargewicht von 11000 von der Säule eluiert. Erst nach tryptischer Spaltung erscheinen sie im Bereich kleinerer Molekulargewichte. Nach Chromatographie auf Bio-Gel P 30 ist erkenntlich, daß die Spaltprodukte in kleinen Molekulargewichten entsprechenden Elutionsvolumina auftreten, die aber mit Sicherheit größere Molekulargewichte als das des freien Leucin repräsentieren.

2. Der zweiten Alternative liegt die Annahme von Artefakten zugrunde. Es ist denkbar, daß in den Mitochondrien ein proteolytisches Enzym vorhanden ist, das spezifisch die naszierenden Peptidketten an den Ribosomen angreift, und sie bis zu einer

gewissen Länge abdaut. Diese Länge würde dann jenen Teil der Peptidkette ausmachen, der innerhalb der ribosomalen Struktur eingebettet ist, und damit nicht für das hypothetische Enzym zugänglich wäre. Damit könnte man die scheinbar höheren Molekulargewichte der Ketten an den Polysomen erklären. Weiterhin würden demnach die polymeren Ketten deshalb bevorzugt aggregieren, weil ein Teil der naszierenden Peptidkette aus der Struktur des Ribosoms herausragt. Gegen diese Interpretation gibt es einige Einwände. Die Gelfiltration zeigt nicht diese Unterschiede im scheinbaren Molekulargewicht von Polymer- und Monomerprodukt wie die Gelelektrophorese. Des weiteren müssen die mit Hilfe der Gelelektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat ermittelten Molekulargewichte mit großer Vorsicht betrachtet werden. Kleinere Peptide zeigen ein stark abweichendes Verhalten in der linearen Abhängigkeit der elektrophoretischen Beweglichkeit von dem Logerithmus der Molekulargewichte. Freies Leucin, z. B.,bleibt zum größten Teil am Auftrag des Gels liegen und wandert nur zu einem kleinen Teil in das Gel. Darüberhinaus ist nicht ausgeschlossen, daß extrem hydrophobe Peptide unter bestimmten Bedingungen Aggregate bilden, die sogar in Gegenwart von SDS auftreten.

3.4. Die Translationsprodukte in der Membran

Ein weiteres Ziel dieser Untersuchungen war es, die an den Ribosomen gebildeten Peptidketten nach ihrer Abgabe in die innere Mitochondrienmembran wiederzufinden, das heißt mit anderen Worten, die an den mitochondrialen Ribosomen gefundenen Peptide mit jenen zu vergleichen, die nach längerer Verfolgung des Proteinsyntheseprozesses in der Membran auftauchen. Die kinetischen Studien, die in dieser Arbeit unterbreitet werden, zeigen jedoch einige Schwierigkeiten bei diesen Verfahren auf. Sie weisen darauf hin, daß jene Banden, die mit den scheinbaren Molekulargewichten zwischen 20000 und 40000 gekennzeichnet sind, keine originalen Translationsprodukte darstellen. Sie weisen

vielmehr darauf hin, daß sie durch Umwandlung von Material mit niedrigem scheinbaren Molekulargewicht, insbesondere von solchem, mit dem Molekulargewicht von 11000 gebildet werden, Offensichtlich findet in der Membran ein Modifikationsprozeß statt, dessen Geschwindigkeit, unter den Gegebenheiten der vorliegenden Experimente, wesentlich langsamer verläuft als der Translationsprozeß an den mitochondrialen Ribosomen. Die Natur dieses Modifikationsprozesses ist unbekannt. Spekulationen haben sich einerseits auf spezifische Aggregationsreaktionen zu richten, so etwa wie der Produkte untereinander oder mit anderen Membrankomponenten wie etwa Proteine oder Phospholipide, andererseits aber auch auf Modifikationsprozesse durch Knüpfung kovalenter Bindungen.

Verfolgt man den Einbau von Translationsprodukten in die mitochondriale Membran in einem System isolierter Mitochondrien, so stellt sich eine Situation dar, die sich wesentlich von der in vivo unterscheidet. Unter den Bedingungen der hier dargestellten Experimente, erscheinen nach gelelektrophoretischer Analyse nur Banden mit den scheinbaren Molekulargewichten von 18000 und 11000, auch nach so langen Einbauzeiten wie einer Stunde. Der in vivo beobachtete Umwandlungsprozeß findet, wenn überhaupt, nur in geringem Maße statt. Es scheint, daß dieser Prozeß behindert ist, wenn sich das Mitochondrium nicht in seiner natürlichen Umgebung, dem Cytoplasma, befindet.

Ohne weitere Kenntnis dieses Modifikationsprozesses scheint es zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht förderlich, die Eigenschaften der Translationsprodukte vor und nach ihrer Integration in die Membran mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese zu vergleichen.

3.5. Arbeitshypothese über den Integrationsprozeß von mitochondrialen Translationsprodukten

Auf welchem Weg gelangen die mitochondrialen Translationsprodukte von den mitochondrialen Ribosomen an ihren funktionellen Ort in der mitochondrialen Innenmembran? Auf der Basis der hier dargestellten Aggregationsneigung der mitochondrial synthetisierten

Peptide erscheint es sehr unwahrscheinlich, daß sie in freiem Zustand durch die Matrix wandern können. Demnach verbleiben zwei Mechanismen zur Diskussion:

1. Die monomeren Ribosomen befördern die fertiggestellten Peptidketten in Form von Peptidyl-Transfer-RNS zur Membran. Dort wird nach Spaltung der Esterbindung das Peptid in die Membran eingefügt und das monomere Ribosom kehrt in den ribosomalen Zyklus zurück.

2. Die mitochondrialen Ribosomen, die an die innere Membran gebunden sind, geben die fertiggestellten Peptidketten direkt in die Membran ab.

Die Diskriminierung zwischen diesen beiden Möglichkeiten setzt die Kenntnis der exakten Lokalisation der Ribosomen innerhalb der Mitochondrien voraus. Wie bereits im Ergebnisteil angedeutet (2.5.), sind dazu drei Situationen denkbar. Die mitochondrialen Ribosomen können in der Matrix frei vorliegen ohne jemals eine Bindung mit der Innenmembran einzugehen. Sie können weiterhin zum Teil frei in der Matrix vorliegen aber eine vorübergehende Bindung an die Membran erfahren. Letzten Endes können sie dauernd an die Innenmembran gebunden sein, sei es entweder in Analogie zu den Verhältnissen im endoplasmatischen Reticulum von exkretorischen Zellen oder sei es im Sinne einer totalen Integration in die Membran. Eine Hypothese im Sinne der letztgenannten Möglichkeit ist für die Mitochondrien von Hefe vorgeschlagen worden (34). Wichtige Aussagen zur Entscheidung zwischen diesen Alternativen können elektronenmikroskopische Aufnahmen von isolierten Mitochondrien in ganzen Zellen geben. Tatsächlich ergibt aber eine Durchsicht der Literatur der letzten 8 Jahre keine eindeutige Antwort zu diesem Problem. In den meisten Zellen, insbesondere in den Zellen von höheren Organismen aber auch in Neurospora crassa finden sich ribosomenartige Partikel in der Matrix der Mitochondrien (31, 35, 36, 37, 38). Ribosomenartig bedeutet in diesem Fall eine starke Anfärbung mit Uranylacetat sowie das Verschwinden dieser Partikel

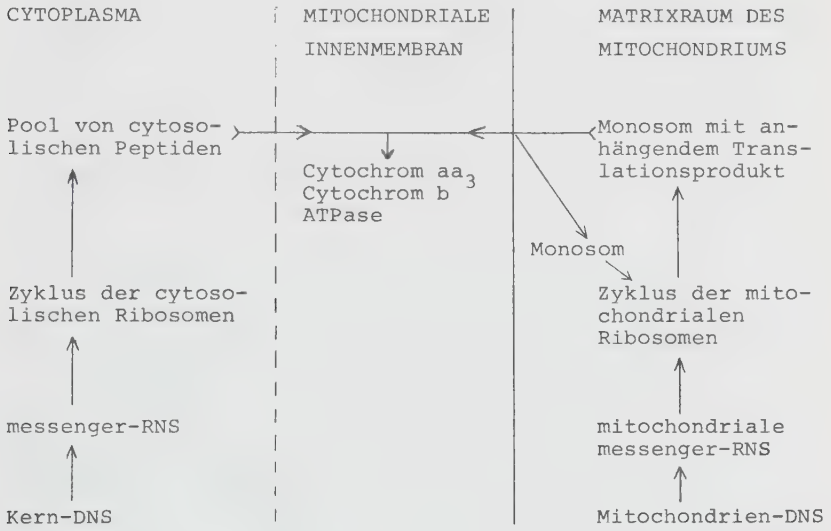
nach Inkubation der Schnitte mit Ribonuclease. Auf der anderen Seite wurden in Hefemitochondrien Strukturen entdeckt, die weitgehend den polymeren Ribosomen des Cytoplasmas gleichen und die sich in unmittelbarer Nähe der mitochondrialen Innenmembran darstellen (31). Aus diesen Aufnahmen geht jedoch nicht hervor, daß die hypothetischen Polymeren fest an die Membran gebunden sind. Allerdings ist danach bereits mit Sicherheit jene Hypothese auszuschließen, die den Ribosomen die Rolle eines integralen Bestandteils der Innenmembran zuschreibt.

In der vorliegenden Arbeit sind Experimente beschrieben, die klar erweisen, daß die mitochondrialen Ribosomen in Neurospora crassa durch Behandlung von isolierten Mitochondrien durch Ultraschall nahezu vollständig befreit werden können. Es ist mit der gewählten Anordnung nicht zu entscheiden, ob ein geringer Rest der Ribosomen an die Membran gebunden bleibt. Im gleichen Sinne setzt wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Mitochondrien einen großen Teil der mitochondrialen Ribosomen frei (50 %). Da im Gegensatz zu dieser Beobachtung bei der identischen Behandlung des rauhen endoplasmatischen Retikulum aus Rattenleber nur eine geringe Abtrennung der Ribosomen (10 %) von der Membran erfolgt, erscheint damit die Beziehung der mitochondrialen Ribosomen zur Innenmembran anderer Natur zu sein. Damit ist freilich eine vorübergehende Bindung der mitochondrialen Ribosomen an die Membran durchaus möglich und vorstellbar.

Es mag weiterhin spekuliert werden, daß die Integration der neugebildeten Peptidketten nicht regellos erfolgt, sondern an bestimmten Stellen. Dies würde implizieren, daß der Aufbau von Enzymkomplexen an sogenannten Wachstumspunkten erfolgt. An Rattenlebermitochondrien sind in vivo und in vitro Argumente vorgebracht worden, daß die Integration vornehmlich in jenem Teil der Innenmembran erfolgt, der die innere Grenzmembran darstellt(39).

Die bisher entwickelten Vorstellungen haben zur Aufstellung einer Arbeitshypothese zum Studium des Mechanismus der Integration

mitochondrialer Translationsprodukte geführt, die im folgenden Schema dargestellt ist.



Membrangebundene Enzyme wie Cytochrom aa_3, Cytochrom b und die Adenosintriphosphatase, sind aus Komponenten zusammengesetzt, die zu einem Teil an den mitochondrialen, zum anderen Teil an den cytosolischen Ribosomen synthetisiert werden (7, 8, 9, 10). Den Zusammenbau der Enzymkomplexe kann man sich so vorstellen, daß er aus einem Pool von cytosolischen und mitochondrialen Peptiden erfolgt. Da die cytosolischen Peptide von den cytosolischen Ribosomen durch die mitochondriale Außenmembran zur Innenmembran transportiert werden müssen, kann man sich vorstellen, daß dieser Pool aus freien Peptiden besteht, und entweder im Cytoplasma oder in der Membran vorliegt. Den Pool der mitochondrialen Peptide stellen die mitochondrialen Ribo-

somen mit anhängenden fertigen Peptidketten dar. Demgemäß zerfällt das mitochondriale Ribosom nach Fertigstellung der Kette nicht in die Untereinheiten um das Peptid in das umgebende Medium abzugeben, sondern es transportiert das fertige Peptid zur Membran. Dort kann dann der Zusammenbau mit den cytosolischen Peptiden zu funktionellen Enzymkomplexen erfolgen. In diesem Prozeß kann die Modifikation der originalen Translationsprodukte inbegriffen sein.

An der Beobachtung des extrem hydrophoben Charakters der mitochondrialen Translationsprodukte seien einige Betrachtungen über den Grund der Existenz eines eigenen mitochondrialen Proteinsynthesesystems geknüpft. Es mag eine notwendige Folge der hydrophoben Eigenschaften der mitochondrialen Translationsprodukte sein, daß sie von der Matrixseite her an die Innenmembran angeliefert werden. Die Möglichkeit eines Transports durch das Cytoplasma und den Intercristaeraum erscheint nämlich auf der Basis dieser Eigenschaften als begrenzt. Auf der Grundlage der Endosymbiontentheorie der Entstehung von Mitochondrien (40, 41, 42, 43, 44) erscheint es demnach nicht unvernünftig anzunehmen, daß deshalb in den Mitochondrien ein System der Transcription und Translation beibehalten werden mußte, um einige wenige Peptide, die für den Aufbau einer funktionsfähigen Innenmembran unbedingt notwendig sind, in dem von dieser Membran umschlossenen Raum zu bilden.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. Züchtung von Neurospora crassa

Hyphen von Neurospora crassa (Wildtyp 74 A) wurden in VOGEL's Minmalmedium (2 % Saccharose) unter sterilen Bedingungen gezüchtet. Inoculiert wurde mit 2 x 10^6 Konidien pro Milliliter Zuchtmedium. Die Zuchtdauer betrug 18 Stunden bei 25°C unter steriler Belüftung in einem beleuchteten Zuchtraum.

4.2. Isolierung von Mitochondrien und m-Ribosomen

4.2.1. Isolierung von m-Ribosomen durch Lysieren der Mitochondrien und Saccharosedichtegradientenzentrifugation

Die Hyphen (Ausbeute etwa 10 g Feuchtgewicht pro 1 Zuchtmedium) wurden auf einer Nutsche abgesaugt und mit 1 l kaltem Wasser und 1 l Isolationsmedium (0,1 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,44 M Saccharose, pH = 7,2) gewaschen. Sie wurden dann in 10 Volumina (bezogen auf das Feuchtgewicht) eiskaltem Inkubationsmedium resuspendiert und 60 sec in einem Braun-Mixer homogenisiert. Die Zellen wurden dann in der von WEISS et al. (45) beschriebenen Mühle aufgeschlossen. Das aus der Mühle fließende Material wurde zur Isolierung der Mitochondrien wie folgt zentrifugiert (Sorvall Zentrifuge, Rotor-Typ SS 34): 10 min 1500 x g; der resultierende Überstand 30 min 10800 x g. Die Sedimente dieser Zentrifugation wurden in Isolationsmedium resuspendiert und 10 min bei 650 x g zentrifugiert. Aus dem resultierenden Überstand wurden dann bei 17300 x g (20 min) die Mitochondrien sedimentiert.

Zur Gewinnung von m-Ribosomen wurden die Mitochondrien in einer Konzentration von 2 - 5 mg/ml AMT-Puffer (100 mM NH_4Cl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, pH = 7,6) aufgenommen und durch Zusatz von Triton X-100 (Endkonzentration 1 %) in einem Glashomogenisator mit Teflonstempel bei Eistemperatur homogenisiert. Das dabei entstandene Lysat wurde einer Reinigungszentrifugation (30 min, 30000 x g) unterzogen. Durch 2-stündige Zentrifugation im Spinco-Rotor Ti 50 bei 144000 x g wurden die Ribosomen sedimentiert. Dazu wurde das Lysat auf eine 2 M Saccharoselösung in AMT (1,5 ml) geschichtet. Die Ribosomen sedimentieren durch die 2 M Saccharoselösung. Anschließend wurden die Ribosomen in 100 -200 µl AMT resuspendiert, in einer Tischzentrifuge zur Entfernung von Verunreinigungen kurz zentrifugiert und danach in einem konvexen Saccharosegradienten,wie von NOLL (46) angegeben, aufgetrennt. (Volumen des Gradienten 11 ml, 10 ml Vorlage einer 10,25 %-igen Saccharose in AMT, Reservoir 48 %-ige Saccharose in AMT) Die Zentrifugation erfolgte im Spinco-Rotor SW 41 bei 286000 x g 2 Stunden bei + 1°C. Durch Auspumpen wurde der Gradient fraktioniert und dabei die Absorption bei 260 nm (A_{260}) im Durchfluß gemessen (Gerät: Zeiss PMQ 2). Eine Einheit A_{260} ist diejenige Menge an Ribosomen, die bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Küvette von 1 cm Weglänge eine Extinktion von 1 ergibt.

4.2.2. Freisetzung von m-Ribosomen aus Mitochondrien durch Ultraschallbehandlung

Die Mitochondrien wurden zu diesem Zweck in einer Konzentration von ca. 3 mg/ml in AMT resuspendiert und mit dem Branson Sonifier (Modell S 75) 5 x 10 sec auf Stufe 5 (5 Amp) im Eisbad beschallt. Die weitere Behandlung wird in Kapitel 2.5. beschrieben.

4.2.3. Freisetzung von m-Ribosomen aus Mitochondrien durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen

Die Mitochondrien wurden in einer Konzentration von ca. 3 mg/ml in AMT resuspendiert. Die Suspension wurde 20 mal in einem Erlenmeyerkolben in einem Aceton-Trockeneis-Bad eingefroren und anschließend bei Zimmertemperatur wieder aufgetaut. Die weitere Behandlung war die gleiche wie im Fall der Ultraschallbehandlung,siehe 4.2.2.

4.3. Isolierung von c-Ribosomen

Zur Gewinnung von c-Ribosomen wurden die Hyphen in einem magnesiumhaltigen Puffer aufgeschlossen (0,44 M Saccharose, 0,1 M Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, pH = 7,2). Die Hyphen wurden nach der in 4.2.1. beschriebenen Methode aufgeschlossen und das Zellhomogenat 2 mal 20 min bei 27000 x g zentrifugiert. Diese beiden Zentrifugationen sedimentieren sowohl Zelltrümmer als auch Mitochondrien. Der Überstand wurde mit Triton X-100 lysiert (Endkonzentration 1 %) und nach einer Reinigungszentrifugation (20 min, 27000 x g) über 2 ml einer 68 %-igen Saccharoselösung in AMT geschichtet. Die c-Ribosomen finden sich nach 2-stündiger Zentrifugation bei 144000 x g im Pellet. Nach Absaugen des Überstandes und oberflächlichem Abspülen des Sediments wurden die Ribosomen in AMT resuspendiert.

4.4. Isolierung von mitochondrialen Membranen

Die isolierten Mitochondrien wurden in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH = 8 beschallt (10 x 15 sec Stufe 6 im Eisbad, Branson Sonifier, Modell S 75). Nach einer Reinigungszentrifugation (20 min, 27000 x g) wurden

die unlöslichen Membranproteine von den löslichen Matrixproteinen durch Zentrifugation getrennt (60 min, 144000 x g).

4.5. Präparation einer rohen Fraktion von mitochondrialen und cytosolischen G-Faktoren in Anlehnung an eine von KÜNTZEL et al. (47) beschriebenen Methode.

Mitochondrien wurden in AMT resuspendiert und 10 x 20 sec auf Stufe 7 mit dem Branson Sonifier Modell S 75 beschallt. Anschließend wurde die Suspension 2 Stunden bei 144000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zu einer Konzentration von 40 % mit Ammoniumsulfat versetzt und 5 Stunden stehenlassen. Die Fällung wurde abzentrifugiert (15 min, 30000 x g), der Überstand weiter mit Ammoniumsulfat auf eine Konzentration von 70 % gebracht, und über Nacht bei 4°C unter Rühren stehengelassen. Die Fällung wurde abzentrifugiert und in AMT-Puffer gelöst (4 mg Protein/ml).

Zur Isolierung einer Fraktion von cytosolischem G-Faktor wurden die Hyphen wie in 4.3. beschrieben in magnesiumhaltigen Puffer aufgeschlossen. Nach Abzentrifugieren der Zellwände und der Mitochondrien wurde der Überstand 3 Stunden bei 144000 x g zentrifugiert. Die weitere Behandlung des Überstandes wurde analog wie im Fall der Isolierung von mitochondrialem G-Faktor durchgeführt.

4.6. Spezifische Markierung des Produktes der mitochondrialen Proteinsynthese.

4.6.1. Spezifische Markierung des Produktes der mitochondrialen Proteinsynthese <u>in vivo</u>.

Nach 18 Stunden Wachstum wurde 1 l der Hyphensuspension mit 0,1 mg/ml Cycloheximid vorinkubiert und anschließend

mit 1 /uCi/ml ^{3}H-Leucin (52 Ci/mMol) 1,5 min unter starker Belüftung inkubiert. Nach dieser Pulsmarkierungperiode wurde dann sofort auf Eistemperatur abgekühlt, indem die Hyphensuspension auf Eiswürfel geschüttet wurde.

4.6.2. Spezifische Markierung des Produktes der mitochondrialen Proteinsynthese in vitro.

Die isolierten Mitochondrien wurden bei Eistemperatur in einem in vitro-Inkubationsmedium (60 ml, 1 - 2 mg Protein/ml) resuspendiert und anschließend für 5 min bei 32°C inkubiert. Die Inkubation wurde durch Abkühlen auf 0°C beendet.

Zusammensetzung des Inkubationsmedium (in Anlehnung an SEBALD et al. (17)):
KCl 30 mM, Saccharose 150 mM, TRA 30 mM, EDTA 2 mM, $MgCl_2$ 10 mM, KH_2PO_4 20 mM, ATP 4 mM, ^{3}H L-Leucin 12,5 /uCi/ml, ferner alle L-Aminosäuren außer Leucin 0,25 mM. Der pH-Wert wurde mit 5N Kalilauge auf 7,6 eingestellt.

4.7. Tryptische Spaltung der Translationsprodukte und RNase-Behandlung

Die Ribosomen wurden in 0,1 M Tris-HCl, 1 % SDS, pH = 8 aufgenommen. Nach Zugabe von Trypsin (10 mg/ml) und Ribonuclease (0,5 mg/ml) wurde 6 Stunden bei 37°C inkubiert.

4.8. Ablösen der Tranlationsprodukte von mitochondrialen und cytosolischen Ribosomen in einem zellfreien System.

Mitochondriale bzw. cytosolische Ribosomen wurden in einer Konzentration von 2 - 4 A_{260}-Einheiten/0,1 ml AMT resuspendiert, 10 min bei 32°C in Anwesenheit von 0,5 mM Puromycin, 0,5 mM GTP und 15 /ul mitochondrialer bzw. cytosolischer G-Faktoren (4 mg/ml) inkubiert und anschließend auf einem konvexen Saccharosegradienten zentrifugiert.

4.9. Säulenchromatographie an Sephadex G 200 und Bio-Gel P 30

Sephadex G 200 und Bio-Gel P 30 wurden unter Rühren mit dem Elutionspuffer (0,1 M Tris-HCl, 0,5 % SDS, pH = 8) 4 Stunden lang äquilibriert. Während der Füllung der Säulen (0,4 x 100 cm) wurde ständig mit gleicher Geschwindigkeit wie bei der Elution Elutionspuffer durch die Säule gepumpt (Sephadex G 200: 250 µl/Stunde, Bio-Gel P 30: 1,2 ml/Stunde) Die Proben wurden in 0,1 M Tris-HCl, 1 % SDS, pH = 8 gelöst und zusammen mit den Eichsubstanzen (Dextranblau, Cytochrom c und ^{14}C-Leucin (2 nCi, 354 mCi/mMol)) auf die Säule aufgetragen. Die Bestimmung der Eichsubstanzen in den Fraktionen erfolgte photometrisch bzw. durch Messung der Radioaktivität.

4.10 Polyacrylamid-SDS-Gelelektrophorese

Für sämtliche Elektrophoresen wurden 15 %-ige Gele verwendet, die aus folgenden Lösungen polymerisiert wurden:

1. 12 g Acrylamid
   320 g Bisacrylamid
   100 µl Tetramethyläthylendiamin
   ad 60 ml Wasser
2. 100 mg Ammoniumperoxodisulfat ad 20 ml Wasser.

Die beiden Lösungen wurden bei Eistemperatur gemischt und dann in Kunststoffformen (Dimension 0,5 x 20 x 8,5 cm) gegossen, in welchen die Auftragsspalten (Volumen 20 µl) vorgeformt waren. Die Gelplatten wurden dann mindestens 24 Stunden mit Elektrophoresepuffer (0,1 M Tris-HCl, 0,5 % SDS, pH = 8) äquilibriert. Das zu trennende Protein wurde in einer Konzentration von 50 - 150 µg/20 µl in detergenzhaltigem Puffer gelöst. Die genauen Lösungsbedingungen bzw. die Vorbehandlungsbedingungen sind jeweils im Text angegeben. Wenn nicht anders vermerkt, wurde die Probe 2 Stunden bei 37°C in 0,1 M Tris-HCl, 1 % SDS, pH = 8 inkubiert.

Nachdem alles Protein bei einer Feldstärke von 5 Volt/cm in das Gel eingewandert war, wurde die Feldstärke auf 15 Volt/cm erhöht. Das Gel wurde beidseitig gekühlt (12°C).

Zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung in den Gelen wurden diese in 1 x 10 mm dicke Scheibchen geschnitten. Die Gelscheibchen wurden in 0,5 ml Elektrophoresepuffer 12 Stunden bei 60°C im Scintillatorgläschen inkubiert, nach dem Abkühlen wurden dann 15 ml Scintillationsflüssigkeit hinzugegeben (6 g PBD, 400 ml Äthylenglycolmonomethyläther und 600 ml Toluol).

Die Eichung der Gele nach Molekulargewichten erfolgte durch Parallellauf von Eichsubstanzen (Rinderserumalbumin = BSA, Lactatdehydrogenase = LDH, Triosephosphatisomerase = TIM, Lactoglobulin a = LAC, Cytochrom c = CYT und Glucagon = GLG), die zur Sichtbarmachung mit Coomassie Brillant Blue R 250 angefärbt wurden (Färbung: 2 - 4 Stunden in 0,25 % Coomassieblau in Methanol-Wasser-Eisessig 5:5:1 v/v/v; entfärbt wurde ca. 40 Stunden im gleichen Lösungsmittel).

4.11. Radioaktivitätsmessungen

Aliquote Volumina der Ribosomensuspensionen, der Säulenfraktionen und der Gradientenfraktionen wurden unmittelbar in Scintillationsflüssigkeit pipettiert. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem Packard-Tricarb-Scintillationszähler. Die Zählausbeute bei alleiniger Zählung von ^{3}H betrug 30 % und von ^{14}C 40 %. Bei Simultanzählung von ^{3}H und ^{14}C war sie 20 bzw. 10 %.

Zur Bestimmung der Radioaktivität die in Mitochondrienprotein oder in mitochondriales Membranprotein eingebaut war, wurden aliquote Mengen der Suspensionen auf Whatman-Glasfaserfilter aufgebracht, die mit 10 % TCA-Äther imprägniert waren. Die Glasfaserfilter wurden wie folgt behandelt:

3 min 10 % TCA 0°C, 15 min 15 % TCA 90°C, 2 mal 1 min 5 % TCA, 2 mal Äthanol/Äther (1 : 1), 1 mal Äther. Dann wurden die Filter getrocknet und nach Zugabe von 15 ml Scintillationsflüssigkeit die Radioaktivität gemessen.

4.12. Proteinbestimmung

Protein wurde nach der Biuretmethode von BEISENHERZ et al. (48) und nach der Methode von LOWRY et al. (49) bestimmt.

4.13. Materialien

Radioaktiv markierte Aminosäuren: Radiochemical Centre, Amersham, England.
Cycloheximid, Puromycin: Sigma Chemical Company, St. Louis, U.S.A.
ATP, GTP, LDH, BSA, LAC, Cytochrom c, RNase: Boehringer, Mannheim.
SDS, Coomassie Brillant Blue, Acrylamid, Bisacrylamid, Tetramethyläthylendiamin, Trypsin, Triäthanolamin: Serva GmbH, Heidelberg.
Saccharose, Tris-HCl, EDTA, Lösungsmittel (p.A.) und Salze (p.A): Merck AG, Darmstadt.
PBD: Koch-Light-Laboratories, Colnbrook, England.
Triton X-100: Packard Instrument Company, Zürich, Schweiz.
Sephadex G 200: Pharmazia, Uppsala, Schweden.
Bio-Gel P 30: Bio-Rad Laboratories, München.
Äthylenglycolmonomethyläther: Farbwerke Hoechst AG, Gendorf.

5. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

AMT Ammoniumchlorid-Magnesiumchlorid-Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ATP Adenosintriphosphat
ATPase Adenosintriphosphatase
BSA Rinderserumalbumin
CHX Cycloheximid
CYT Cytochrom c
DNS Desoxiribonucleinsäure
EDTA Äthylendinitrilotetraessigsäure
GLG Glucagon
GTP Guanosintriphosphat
LAC Lactoglobulin a
LDH Lactatdehydrogenase
MG Molekulargewicht
PBD 2-(4-t-Butylphenyl)-5-(biphenylyl)-1,3,4,-oxadiazol
RNase Ribonuclease
RNS Ribonucleinsäure
SDS Natriumdodecylsulfat
TCA Trichloressigsäure
TIM Triosephosphatisomerase
TRA Triäthanolamin
Tris Tris (hydroxymethyl)-aminomethan

6. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die selektive Markierung der naszierenden Peptidketten an den Ribosomen gelingt mit zwei verschiedenen Versuchsanordnungen: durch Einbau von radioaktiven Aminosäuren in Neurospora-Zellen in Gegenwart von Cycloheximid und den Einbau von radioaktiven Aminosäuren in isolierte Mitochondrien.

2. Die naszierenden Peptidketten liegen an den isolierten Ribosomen in Form von Peptidyl-Transfer-RNS vor. Zur Untersuchung der Peptidketten wurden die Ribosomen mit Hilfe von Natriumdodecylsulfat in ihre Bestandteile zerlegt. Bei dieser Behandlung erfolgt eine Hydrolyse der Esterbindung, die um so schneller verläuft, je höher das pH des Mediums ist. Die Abtrennung der Transfer-RNS kann auch durch RNase-Behandlung erzielt werden.

3. Die Peptide zeigen nach gelchromatographischer Analyse Molekulargewichte von ca. 11000. Im Bereich kleinerer Molekulargewichte sind keine Peptide zu beobachten. Durch Behandlung mit Trypsin entstehen aus den Spezies mit dem Molekulargewicht von ca. 11000 kleinere Peptide.

4. Im Gegensatz zu den naszierenden Peptidketten an den cytosolischen Ribosomen sind diejenigen an den mitochondrialen Ribosomen durch eine extreme Aggregationsneigung ausgezeichnet. In Abwesenheit von Detergenzien können sie nicht in Lösung gehalten werden. Dabei aggregieren nicht nur freie Peptide, sondern auch die Peptidyl-Transfer-RNS wie auch die Peptidyl-Puromycin-Verbindungen.

5. Auch die mitochondrialen Ribosomen sind durch starke Aggregationsneigung gekennzeichnet, wiederum im Gegensatz zu den cytosolischen Ribosomen. Dies ist zum größten Teil auf die anhängenden Peptidketten zurückzuführen. Im Zusammenhang mit dieser Beobachtung muß angenommen werden, daß es sich bei den polymeren Ribosomen, die in Ribosomen-

präparationen gefunden werden, um artifizielle Aggregate und nicht um funktionelle messenger-RNS-Polyribosomenkomplexe handelt.

6. Die Peptidketten, die mit den mitochondrialen polymeren Ribosomen assoziiert sind, sind verschieden von jenen der Monosomen. Im ersten Fall zeigen die naszierenden Peptidketten eine breite Verteilung der Molekulargewichte, während die an monomeren Ribosomen befindlichen in ihrem scheinbaren Molekulargewicht sehr uniform erscheinen. In Form von Peptidyl-Transfer-RNS sind sie gekennzeichnet durch ein scheinbares Molekulargewicht von 27000, in Form der freien Peptide erscheinen sie nach gelelektrophoretischer Analyse als zwei Banden im Bereich scheinbarer Molekulargewichte von 5000 - 10000. Im Fall der cytosolischen Ribosomen beobachtet man keine Unterschiede zwischen den Peptidketten an den polymeren und monomeren Ribosomen. In beiden Fällen ergibt sich eine breite Verteilung der scheinbaren Molekulargewichte.

7. Die mitochondrialen Ribosomen liegen innerhalb der Mitochondrien in einer Form vor, die es erlaubt, sie durch mechanisches Öffnen der Mitochondrienmembran (Ultraschall) aus den Mitochondrien zu befreien. Zusammen mit dem Befund der Nicht-Ablösbarkeit der am endoplasmatischen Retikulum der Rattenleberzelle gebundenen Ribosomen durch identische Behandlung führt zu dem Schluß, daß die mitochondrialen Ribosomen zumindest nicht eine dauernde feste Bindung an die mitochondriale Innenmembran eingehen.

8. Das Erscheinen der mitochondrialen Translationsprodukte in der mitochondrialen Innenmembran wurde durch elektrophoretische Untersuchung des isolierten Membranmaterials verfolgt. Nach Einbau von radioaktiven Aminosäuren in vivo in Gegenwart von Cycloheximid beobachtet man nach kurzzeitiger Markierung im wesentlichen das Auftreten von Banden im scheinbaren Molekulargewichtsbereich von 10000 - 18000. Mit

zunehmender Inkubationsdauer erscheinen die Banden mit höheren scheinbaren Molekulargewichten im Bereich von 20000 - 40000. Gleichzeitig beobachtet man eine Abnahme der Banden mit den niedrigen Molekulargewichten. Dies deutet auf den Ablauf eines Modifikationsprozesses in der Membran hin, der zur Umwandlung von Material mit niedrigem scheinbaren Molekulargewicht in solches mit höherem scheinbaren Molekulargewicht führt. In isolierten Mitochondrien findet dieser Prozess nicht statt, oder nur zu einem geringen Ausmaß.

9. Auf der Basis der in dieser Arbeit erhobenen Befunde wird folgende Arbeitshypothese aufgestellt:
Die Integration der mitochondrialen Translationsprodukte findet in der Weise statt, daß das mitochondriale monomere Ribosom die fertige Peptidkette in Form von Peptidyl-Transfer-RNS zur Innenmembran transportiert, und sie dort an definierten Stellen abgibt. Der extrem hydrophobe Charakter dieser Peptidketten macht es unmöglich, daß sie frei durch den Matrixraum wandern können. Da sie auf Grund eben dieser Eigenschaft auch nicht durch das Cytoplasma und den Intercristaeraum wandern können, liegt nahe, daß es nötig ist, sie innerhalb der Mitochondrien zu bilden. Dies wiederum könnte der Grund dafür sein, daß die Mitochondrien ein eigenes Proteinsynthesesystem besitzen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

(1) BORST, P., Annu. Rev. Biochem. 41, 333 (1972)
(2) SCHATZ, G., in "Membranes of Mitochondria and Chloroplasts" (Van Nostrand Reinhold Co., New York), 1970, p. 251
(3) ASHWELL, M., and WORK, T.S., Annu. Rev. Biochem. 39, 251 (1970)
(4) BEATTIE, D.S., Sub-Cell. Biochem. 1, 1 (1971)
(5) GROSS, S.R., McCOY, M.T., and GILMORE, E.B., Proc. Natl. Acad.Sci. 61, 253 (1968)
(6) BARATH, Z., and KÜNTZEL, H., Nature New Biol. im Druck
(7) WEISS, H., SEBALD, W., and BÜCHER, Th., Eur. J. Biochem. 22, 19 (1971)
(8) SEBALD, W., WEISS, H., and JACKL, G., Eur. J. Biochem. 30, 413 (1972)
(9) WEISS, H., Eur. J. Biochem. 30, 469 (1972)
(10) TZAGOLOFF, A., and MEAGHER, P., J. Biol. Chem. 247,594 (1972)
(11) LAMB, A.J., CLARK-WALKER, G.D., LINNANE, A.W., Biochim. Biophys. Acta 161, 415 (1968)
(12) MICHEL, R., SCHWEYEN, R.J., and KAUDEWITZ, F., Molec. Gen. Genetics 111, 235 (1971)
(13) MITCHELL, M.B., and MITCHELL, H.K., Proc. Natl. Acad. Sci. 38, 442 (1952)
(14) NEUPERT, W., SEBALD, W., SCHWAB, A.J., PFALLER, A., and BÜCHER, Th., Eur. J. Biochem. 10, 585 (1969)
(15) NATHANS, D., Biochemistry 51, 585 (1964)
(16) RICH, A., WARNER, J,R., GOODMAN, H.M., Cold Spring Harb. Symp on Quant. Biol. XXVIII (1963) p. 269
(17) SEBALD, W., BÜCHER, Th., OLBRICH, B., and KAUDEWITZ, F., FEBS Lett. 1, 235 (1968)
(18) WEBER, K., and OSBORN, M., J. Biol. Chem. 244, 4406 (1969)
(19) SEBALD, W., SCHWAB, A.J., and BÜCHER, Th., FEBS Lett. 4, 243 (1969)
(20) SCHATZ, G., Biochem. J. 116, 8 (1969)

(21) HAWLEY, E.S., and GREENAWALT, J.W., J. Biol. Chem. 245 3574 (1970)
(22) HASTINGS, J.R.B., and KIRBY, K.S., Biochem. J. 100, 532 (1966)
(23) KÜNTZEL, H., and NOLL, H., Nature 215, 1340 (1967)
(24) RIFKIN, M.R., WOOD, D.D., and LUCK, D.G.L., Proc. Natl. Acad. Sci. 58, 1025 (1967)
(25) BRDICZKA, D., PETTE, D., BRUNNER, G., and MILLER, F., Eur. J. Biochem. 5, 294 (1968)
(26) NEUPERT, W., MASSINGER, P., and PFALLER, A., in "Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts" (North Holland) 1971, p. 328
(27) KÜNTZEL, H., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 54, 94 (1971)
(28) LINNANE, A.W., HASLAM, J.M., Curr. Top. Cell. Reg. 2, 101 (1970)
(29) ATTARDI, G., and OJALA, D., Nat. New Biol. 229, 133 (1971)
(30) OJALA, D., and ATTARDI, G., J. Mol Biol. 65, 273 (1972)
(31) VIGNAIS, P.V., STEVENS, B.J., HUET, J., and ANDRE, J., J. Cell Biol. 54, 468 (1972)
(32) FRIEDMANN, H., LU, P., and RICH, A., Cold Spring Harb. Symp. on Quant. Biol. XXXIV (1969) p. 255
(33) MICHEL, R., und NEUPERT, W., unveröffentlichte Ergebnisse
(34) FORRESTER, I.T., NAGLEY, P., and LINNANE, A.W., FEBS Lett. 11, 59 (1970)
(35) ANDRE, J., and MARINOZZI, V., J. Microsc. 4, 615 (1965)
(36) VIGNAIS, P.V., HUET, J., and ANDRE, J., FEBS Lett. 3, 177 (1969)
(37) STEGEMANN, W.J., COOPER, C.S., AVERS, C.J., Biochem. Biophys. Res. Commun. 39, 69 (1970)
(38) KLEINOW, W., NEUPERT, W., and MILLER, F., Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft 66, Mainz 1972, im Druck
(39) LIZARDI, P.M., and LUCK, D.G.L., J. Cell Biol. 54, 56 (1972)

(40) NASS, S., Int. Rev. Cytol. 25, 55 (1969)
(41) SAGAN, L., J. Theoret. Biol. 14, 225 (1967)
(42) RABINOWITZ, M., SWIFT, H., Phys. Rev. 50, 376 (1970)
(43) SWIFT, H., WOLSTENHOLME, D.R., Handbook of Molecular Cytology, ed. A. Lima-de-Faria, p. 972 Amsterdam: North-Holland (1969)
(44) MARGULIS, L., Ed. Origin of Eukaryotic Cells. New Haven/London: Yale Univ. Press
(45) WEISS, H., v. JAGOW, G., KLINGENBERG, M., and BÜCHER, Th., Eur. J. Biochem. 14, 75 (1970)
(46) NOLL, H., Nature 215, 360 (1967)
(47) GRANDI, M., HELMS, A., and KÜNTZEL, H., Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 864 (1971)
(48) BEISENHERZ et al. Z. Naturforschung 8b, 555 (1953)
(49) LOWRY et al. J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

LEBENSLAUF

Am 12.1.1942 wurde ich, Rainer Michel, als dritter von drei Söhnen des technischen Angestellten Egon Michel und seiner Ehefrau Elsa, geborene Dorschner, in Falkenau/Eger CSSR geboren. Im Jahre 1946 wurden wir nach Hassenhausen im Landkreis Marburg/Lahn ausgesiedelt, wo ich ab 1949 die Volksschule besuchte. Seit 1954 wohnen meine Eltern in Burgkirchen/Alz. Von dort aus besuchte ich die Oberrealschule in Mühldorf/Inn, an der ich 1963 die Reifeprüfung bestand. Von Oktober 1963 bis März 1965 leistete ich Wehrdienst und begann im Sommersemester 1965 das Biologiestudium an der hiesigen Universität. 1967 legte ich die Vordiplomprüfung ab, 1969 die Hauptdiplomprüfung. Bis August 1970 fertigte ich meine Diplomarbeit im Institut für Genetik der Universität München an. Seit September 1970 arbeite ich am Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität. An diesem Institut entstand unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. h.c. Th. Bücher und Herrn PD Dr. rer. nat. Dr. med. W. Neupert diese Doktorarbeit.